



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1013867-6 B1



(22) Data do Depósito: 23/04/2010

(45) Data de Concessão: 27/10/2020

(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO, POLIPEPTÍDEO, CASSETTE DE TRANSCRIÇÃO, VETOR E COMPOSIÇÃO DE VACINA

(51) Int.Cl.: A61K 39/008.

(30) Prioridade Unionista: 23/04/2009 GB 0906906.3.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF EDINBURGH; THE UNIVERSITY OF YORK.

(72) Inventor(es): PAUL KAYE; DEBORAH SMITH; CHARLES LACEY; ANTON AEBISCHER.

(86) Pedido PCT: PCT GB2010000815 de 23/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/122310 de 28/10/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/10/2011

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO Descrição de genes sintéticos de ocorrência não-natural e seu uso em uma vacina para fornecer tratamento profilático e terapêutico de leishmaniose.

MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO, POLIPEPTÍDEO, CASSETTE DE TRANSCRIÇÃO, VETOR E COMPOSIÇÃO DE VACINA

A invenção se refere a genes sintéticos de ocorrência não-natural e seu uso em uma vacina no fornecimento de benefício profilático e terapêutico contra leishmaniose.

Os parasitas protozoários sustentados por insetos divergentes evolucionários da ordem Kinetoplastidae causam uma variedade de doenças humanas e animais, inclusive leishmaniose (um amplo espectro de infecções causadas pela espécie *Leishmania*), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e doença do sono africana (*T. brucei*). Estas infecções são de prevalência crescente em países em desenvolvimento onde a mortalidade é frequentemente afetada por acesso precário a saúde. Muitas das drogas disponíveis para tratar estas doenças são caras, difíceis de administrar ou tóxicas. Nenhuma vacina eficaz é disponível.

Leishmaniose ameaça milhões de pessoas em cerca de 88 países e resulta em alto nível de morte nos infectados e desenvolvimento social/econômico tardio dos países em que a doença é endêmica. A doença tem uma série de sintomas dependendo da espécie de infectante. Por exemplo, a forma cutânea da doença é causada pela *Leishmania aethiopica*, *L. mexicana*, *L. major*, e *L. tropica*; a forma mucocutânea por *L. braziliensis* e a forma visceral por *L. chagasi*, *L. donovani* e *L. infantum*. O vetor que transmite a doença é uma mosca de areia, uma das muitas espécies do gênero *Phlebotomus* spp [ex. *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus*] e *Lutzomyia* spp [ex. *Lutzomyia longipalpis*]. Os reservatórios domésticos de leishmaniose são cachorros que podem ser assintomáticos e, portanto tanto cachorros que apresentam a doença e aqueles que não podem ser infectados quando mordidos por uma mosca de areia. Os gatos também podem portar *Leishmania*, mas são considerados transportadores secundários. Há, portanto, necessidade de controlar a infecção não apenas em humanos, mas também em espécies animais que agem como reservatórios.

O controle quimioterápico da leishmaniose é insatisfatório devido a efeitos colaterais graves, falta de eficácia e custo. As drogas atuais incluem antimonial pentavalente, pentamida, pirazolopirimidinas, anfotericina B, aminosidina, paromomicina e miltefosina. Em alguns casos, embora a doença possa ser controlada em cachorros, eles permanecem infecciosos. Atualmente, nenhuma vacina eficaz é disponível, embora tentativas de desenvolver vacinas protetoras e terapêuticas sejam conhecidas.

Por exemplo, o uso de organismos de *Leishmania* completos atenuados é divulgado em WO2005/021030. A vacina usa organismos vivos de *Leishmania*

que sofreram mutação que tem uma ruptura direcionada do gene centrina. A proteína centrina é encontrada no centrossomo e age no movimento de corpos centríolos/basais. Os organismos de *Leishmania* que são deficientes em centrina mostram crescimento celular inibido. Em WO98/44943 é descrito outro exemplo de uma vacina de *Leishmania* atenuada. A vacina inclui *Leishmania* viva que transporta deleções em proteases de cisteína que são desprovidas de manifestação da doença. Em WO99/51264 o uso de proteases de cisteína per se é descrito em composições de vacina de sub-unidade para fornecer imunidade protetora. Uma abordagem de vacina de sub-unidade é descrita em CA2, 540, 736 que utilizou 34 antígenos principais de *Leishmania* secretados para provocar uma resposta imune em camundongos. Abordagens de vacina de sub-unidade semelhantes são descritas em WO2008/064181 ; WO2007/121184; WO2005/049806; e EP1615663B1.

Esta divulgação se refere à criação de genes sintéticos e seu uso na vacinação de leishmaniose.

De acordo com um aspecto da invenção, é fornecida uma molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo não-natural que compreende antígenos leishmaniais.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal molécula de ácido nucléico codifica um polipeptídeo não-natural que compreende antígenos leishmaniais em que tal antígeno compreende ou consiste da seqüência de aminoácidos GGPKEGENL e/ou HYEKFERMI.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecido um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecida uma molécula de ácido nucléico que compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionados a partir do grupo que consiste em:

(i) uma molécula de ácido nucléico que consiste da seqüência de nucleotídeos conforme representada nas Figuras 10a, 11 a, 12a ou 13a;

(ii) uma molécula de ácido nucléico que compreende seqüências de nucleotídeos que hibridizam à seqüência identificada em (i) acima sob condições de hibridização rigorosas e que codificam polipeptídeos com antígenos leishmaniais; e (iii) uma molécula de ácido nucléico que compreende seqüências de nucleotídeos que são degeneradas como resultado do código genético para a seqüência de nucleotídeos definida em (i) e (ii).

A hibridização de uma molécula de ácido nucléico ocorre quando duas

moléculas de ácido nucléico complementares são submetidas a uma quantidade de hidrogênio que liga uma a outra. O rigor de hibridização pode variar de acordo com as condições ambientais em torno dos ácidos nucléicos, a natureza do método de hibridização, e a composição e comprimento das moléculas de ácido nucléico usadas. Os cálculos relativos à condições de hibridização exigidas para obter graus específicos de rigor são discutidos em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001); e Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology — Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I1 Chapter 2 (Elsevier, New York, 1993). T_m é a temperatura em que 50% de um determinado filamento de uma molécula de ácido nucléico é hibridizado para seu filamento complementar. O seguinte é um exemplo de conjunto de condições de hibridização e não é limitante:

Rigor muito alto (permite que seqüências que compartilham pelo menos 90% de identidade hibridizem) Hibridização: 5x SSC a 65°C por 16 horas

Lavar duas vezes: 2x SSC em temperatura ambiente (RT) por 15 minutos cada

Lavar duas vezes: 0.5x SSC a 65°C por 20 minutos cada

Alto Rigor (permite que seqüências que compartilham pelo menos 80% de identidade hibridizem)

Hibridização: 5x-6x SSC a 65°C-70°C por 16-20 horas

Lavar duas vezes: 2x SSC a RT por 5-20 minutos cada

Lavar duas vezes: 1x SSC a 55°C-70°C por 30 minutos cada

Baixo Rigor (permite que as seqüências que compartilham pelo menos 50% de identidade hibridizem)

Hibridização: 6x SSC a RT até 55°C por 16-20 horas

Lavar pelo menos duas vezes: 2x-3x SSC a RT até 55°C por 20-30 minutos cada.

Em uma modalidade preferencial da invenção é fornecida uma molécula de ácido nucléico que compreende ou consiste de uma seqüência de nucleotídeos conforme representado na Figura 10a.

Em uma modalidade preferencial da invenção é fornecida uma molécula de ácido nucléico que compreende ou consiste de uma seqüência de nucleotídeos conforme representado na Figura 11a.

Em uma modalidade preferencial da invenção é fornecida uma molécula de ácido nucléico que compreende ou consiste de uma seqüência de nucleotídeos

conforme representado na Figura 12a.

Em uma modalidade preferencial da invenção é fornecida uma molécula de ácido nucléico que compreende ou consiste de uma seqüência de nucleotídeos conforme representado na Figura 13a.

5 De acordo com outro aspecto da invenção é fornecido um polipeptídeo codificado por uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal polipeptídeo é um polipeptídeo variante e compreende a seqüência de aminoácidos representada na Figura 10b, seqüência a qual foi modificada por deleção, adição ou substituição
10 de pelo menos um resíduo de aminoácido.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal polipeptídeo é um polipeptídeo variante e compreende a seqüência de aminoácidos representada na Figura 11b, seqüência a qual foi modificada por deleção, adição ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido.

15 Em uma modalidade preferencial da invenção tal polipeptídeo é um polipeptídeo variante e compreende a seqüência de aminoácidos representada na Figura 12b, seqüência a qual foi modificada por deleção, adição ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal polipeptídeo é um
20 polipeptídeo variante e compreende a seqüência de aminoácidos representada na Figura 13b, seqüência a qual foi modificada por deleção, adição ou substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido.

Um polipeptídeo variante pode diferir em seqüência de aminoácidos por uma ou mais substituições, adições, deleções, truncações que podem estar
25 presentes em qualquer combinação. Entre as variantes preferenciais estão aquelas que variam a partir de polipeptídeo de referência por substituições de aminoácidos conservadoras. Tais substituições são aquelas que substituem um determinado aminoácido por outro aminoácido de características semelhantes. Na seguinte lista não-limitadora de aminoácidos são consideradas substituições
30 conservadoras (semelhantes): a) alanina, serina, e treonina; b) ácido glutâmico e ácido aspártico; c) asparagina e glutamina d) arginina e lisina; e) isoleucina, leucina, metionina e valina e f) fenilalanina, tirosina e triptofano. Mais preferenciais são as variantes que retém ou realçam a mesma função biológica e atividade que o polipeptídeo de referência do qual variam.

35 Além disso, a invenção apresenta seqüências de polipeptídeos tendo pelo menos 50-75% de identidade com as seqüências de polipeptídeos conforme

divulgado no presente documento, ou fragmentos e seus polipeptídeos funcionalmente equivalentes. Em uma modalidade, os polipeptídeos têm pelo menos 85% de identidade, mais preferencialmente pelo menos 90% de identidade, ainda mais preferencialmente pelo menos 95% de identidade, ainda mais preferencialmente 97% de identidade, e mais preferencialmente ainda 99% de identidade com as seqüências de aminoácidos aqui ilustradas.

De acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um cassete de transcrição compreendendo: uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção operacionalmente ligada a um promotor adaptado para transcrição da molécula de ácido nucléico associada ao mesmo.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal promotor é um promotor constitutivo.

Em uma modalidade preferencial alternativa da invenção tal promotor é um promotor regulável; preferencialmente um promotor induzível e/ou um promotor específico de tecido/célula.

"Promotor" é um termo reconhecido na técnica e, para fins de esclarecimento, inclui as seguintes características que são fornecidas apenas para exemplo. Os elementos realçadores são seqüências de ácido nucléico de atuação cis com freqüência encontradas 5' ao local de iniciação da transcrição de um gene (os realçadores também podem ser encontrados 3' a uma seqüência de genes ou até mesmo localizados em seqüências intrônicas). Os realçadores funcionam para aumentar a taxa de transcrição do gene ao qual o realçador é ligado. A atividade do realçador é responsiva a fatores de transcrição de atuação trans que mostraram se ligar especificamente a elementos realçadores. A ligação/atividade dos fatores de transcrição (ver, por favor, Eukaryotic Transcription Factors, por David S Latchman, Academic Press Ltd, San Diego) é responsiva a uma série de pistas fisiológicas/ambientais. Os elementos promotores também incluem a chamada caixa de TATA e seqüências de iniciação de RNA polimerase que funcionam para selecionar um local de iniciação de transcrição. Estas seqüências também ligam polipeptídeos que funcionam, inter alia, para facilitar a seleção de iniciação de transcrição por RNA polimerase.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal promotor é um promotor específico de músculo esquelético.

Promotores específicos de músculo são conhecidos na técnica. Por exemplo, WO0009689 divulga um gene expresso preferencialmente por músculo estriado e promotor cognato, o gene SPEG. EP1072680 divulga a região

regulatória do gene mioestatina. O gene mostra um padrão específico predominantemente muscular de expressão de genes. US5795872 divulga o uso do promotor de creatina quinase para alcançar altos níveis de proteínas estranhas em tecido muscular. O gene específico de músculo Myo D também mostra um padrão de expressão restrito a mioblastos. Outros exemplos são divulgados em WO03/074711 que é incorporado por referência.

Preferencialmente tal promotor constitutivo é selecionado do grupo que consiste em:

Promotor citomegalovírus (CMV), realçador β -globina RSV/promotor de fosfoglicerato quinase (camundongo PGK), promotor de alfa-actina, promotor de SV40 promotor de EF-1 α , promotor de ubiquitina, promotor de fator A (Tfam) de transcrição.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecido um vetor que compreende uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal vetor é um vetor de expressão adaptado para expressão de tal molécula de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção; preferencialmente tal molécula de ácido nucléico é operacionalmente ligada a pelo menos uma seqüência de promotor.

As adaptações também incluem o fornecimento de marcadores selecionáveis e seqüências de replicação autônomas que facilitam a manutenção de tal vetor tanto em célula eucariótica como em hospedeiro procariótico. Os vetores que são mantidos de forma autônoma são denominados vetores epissomais. Vetores epissomais são desejáveis uma vez que estas moléculas podem incorporar fragmentos grandes de DNA (DNA de 30-50kb). Vetores epissomais deste tipo são descritos em WO98/07876. As adaptações que facilitam a expressão de genes codificados por vetores incluem o fornecimento de seqüências de terminação/poliadenilação de transcrição. Isto também inclui o fornecimento de locais de entrada de ribossomos internos (IRES) que funcionam para maximizar a expressão de genes codificados por vetores dispostos em cassetes de expressão bi-cistrônicos ou multi-cistrônicos. As seqüências de controle de expressão também incluem as chamadas Regiões de Controle de Local (LCRs). Estes são elementos regulatórios que conferem expressão independente de posição, dependente de número de cópias a genes ligados quando analisados como construtos transgênicos. LCRs incluem elementos regulatórios que isolam transgenes dos efeitos de silenciamento de

heterocromatina adjacente, Grosveld et al., *Cell* (1987), 51 : 975-985. Os elementos regulatórios também incluem seqüências 2a; ver Luke et al *J Gen Virology* [2008] 89 1036- 1042; Osbourne et al *Mol Therapy* [2005] 12 [3]: 569-74.

Há uma quantidade significativa de livros especializados publicados relacionados a técnicas de construção de vetores de expressão e DNA recombinante no geral. Por favor, ver Sambrook et al (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY e suas referências; Marston, F (1987) *DNA Cloning Techniques: A Practical Approach Vol III* IRL Press, Oxford UK; DNA Cloning: F M Ausubel et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

O uso de vírus ou “vetores virais” como agentes terapêuticos é bem conhecido na técnica. Além disso, uma série de vírus é geralmente usada como vetores para a entrega de genes exógenos. Os vetores geralmente empregados incluem vírus de DNA e RNA não-envelopados ou envelopados recombinantemente modificados, preferencialmente selecionados a partir de retroviridae, baculoviridae, parvoviridae, picornaviridae, herpesviridae, poxviridae, adenoviridae, or picornaviridae. Vetores quiméricos também podem ser empregados explorando elementos vantajosos de cada uma das propriedades de vetores principais (Ver, ex., Feng, et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:866-870). Tais vetores virais podem ser do tipo selvagem ou modificados por técnicas de DNA recombinante para serem deficientes em replicação, de condicionalmente replicantes ou competentes em replicação. Vetores preferenciais são derivados de genomas retrovirais [ex., lentivirus] ou são de base adenoviral.

Os vetores virais podem ser condicionalmente replicantes ou competentes em replicação. Vetores virais condicionalmente replicantes são usados para alcançar expressão seletiva em tipos celulares específicos enquanto evitam infecção de amplo espectro inconveniente. Exemplos de vetores condicionalmente replicantes são descritos em Pennisi, E. (1996) *Science* 274:342-343; Russell, and S.J. (1994) *Eur. J. of Cancer* 30A(8):1165-1171. Exemplos adicionais de vetores seletivamente replicantes incluem aqueles vetores em que um gene essencial para replicação do vírus está sob controle de um promotor que é ativo apenas em um tipo celular ou estado celular específico de modo que na ausência de expressão de tal gene, o vírus não se replicará. Exemplos de tais vetores são descritos em Henderson, et al., Patente N° U.S. 5.698.443 emitida em 16 de dezembro de 1997 e Henderson, et al.; Patente N° U.S. 5.871.726 emitida em 16 de fevereiro de 1999, cujas instruções completas

são incorporadas no presente documento por referência.

Além disso, o genoma viral pode ser modificado para incluir promotores induzíveis que alcançam replicação ou expressão apenas sob certas condições. Exemplos de promotores induzíveis são conhecidos na literatura científica (Ver, ex. Yoshida e Hamada (1997) Biochem. Biophys. Res. Comm. 230:426-430; Iida, et al. (1996) J. Virol. 70(9):6054- 6059; Hwang, et al. (1997) J. Virol 71 (9):7128-7131 ; Lee, et al. (1997) Mol. Cell. Biol. 17(9):5097-5105; e Dreher, et al. (1997) J. Biol. Chem 272(46); 29364-29371.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecida uma composição de vacina que compreende uma molécula de ácido nucléico ou parte da mesma de acordo com a invenção.

De acordo com um aspecto da invenção é fornecida uma composição de vacina que compreende um polipeptídeo ou parte do mesmo de acordo com a invenção.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal composição inclui um transportador e/ou opcionalmente um adjuvante.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal adjuvante é selecionado a partir do grupo que consiste em citosinas selecionadas a partir do grupo que consiste em, por exemplo, GMCSF, interferon gama, interferon alfa, interferon beta, interleucina 12, interleucina 23, interleucina 17, interleucina 2, interleucina 1, TGF, TNF α , e TNF β

Em outra modalidade alternativa da invenção tal adjuvante é um agonista TLR tal como oligonucleotídeos CpG, flagellina, monofosforil lipídeo A, poli I C e seus derivados.

Em uma modalidade preferencial da invenção tal adjuvante é um derivado de parede celular bacteriana tal como dipeptídeo de muramil (MDP) e/ou trehalose dicorinemicolato (TDM).

Um adjuvante é uma substância ou procedimento que aumenta respostas imunes específicas a antígenos modulando a atividade de células imunes. Exemplos de adjuvantes incluem, para fins de exemplo apenas, anticorpos agonísticos a moléculas co-estimulantes, adjuvante de Freund, dipeptídeos de dimuramil e lipossomos. Um adjuvante é, portanto, um imunomodulador. Um transportador é uma molécula imunogênica que, quando ligada a uma segunda molécula aumenta as respostas imunes à última. O termo transportador é interpretado da seguinte forma. Um transportador é uma molécula imunogênica que, quando ligada a uma segunda molécula aumenta respostas imunes a esta.

Alguns antígenos não são intrinsecamente imunogênicos ainda que possam ser capazes de gerar respostas de anticorpo quando associados a uma molécula de proteína estranha tal como hemocianina do molusco keyhole limpet e toxóide de tétano. Tais antígenos contêm epítomos de célula B, mas não epítomos de célula T. A porção de proteína de tal conjugado (a proteína “transportadora”) fornece epítomos de célula T que estimulam células T helper que, por sua vez, estimulam células B de antígenos específicos a se diferenciar em células plasmáticas e produzir anticorpo contra as células T helper para que também possam estimular outras células imunes tais como células T citotóxicas e um transportador possa desempenhar um papel análogo em gerar imunidade mediada por células, bem como anticorpos. Certos antígenos que são desprovidos de epítomos de célula T, tal como polímeros com um epítomo de célula B de repetição (ex. polissacarídeos bacterianos), são intrinsecamente imunogênicos a uma certa proporção. Estes são conhecidos como antígenos T-independentes. Tais antígenos se beneficiam da associação com um transportador tal como toxóide de tétano, circunstância sob a qual extraem respostas de anticorpo muito mais fortes.

De acordo com outro aspecto da invenção é fornecida uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção para uso na fabricação de uma vacina.

De acordo com outro aspecto da invenção é fornecido um polipeptídeo de acordo com a invenção para uso na fabricação de uma vacina.

De acordo com outro aspecto da invenção é fornecido um método para vacinar um sujeito compreendendo administrar uma vacina de acordo com a invenção.

Em um método preferencial da invenção tal sujeito é um humano.

Em um método preferencial alternativo da invenção tal sujeito é um animal não-humano.

Preferencialmente, tal animal é um cachorro.

Em um método preferencial da invenção tal vacinação é combinada com a administração de um composto anti-leishmanial.

Preferencialmente tal composto é selecionado a partir do grupo que consiste em, por exemplo, antimonial pentavalente, pentamida, pirazolopirimidinas, anfotericina B, aminosidina, paramomicina e miltefosina.

Em um método preferencial alternativo da invenção tal composto anti-leishmanial é um inibidor de tirosina quinase receptora, por exemplo, maleato de sunitinibe.

Em um método preferencial da invenção tal composto é administrado

separadamente, simultaneamente ou sequencialmente.

Ao longo da descrição e reivindicações deste relatório descritivo, as palavras “compreendem” e “contém” e variações destas, por exemplo, “compreendendo” e “compreende”, significa “inclusive, mas não limitado a”, e não se destinam a excluir outras porções, aditivos, componentes, números inteiros ou etapas.

Ao longo da descrição e reivindicações deste relatório descritivo, o singular compreende o plural, salvo se o contexto exigir de outra forma. Especificamente, onde o artigo indefinido for usado, o relatório descritivo deve ser entendido como contemplando pluralidade bem como singularidade, salvo se o contexto exigir de outra forma.

Recursos, números inteiros, características, compostos, porções químicas ou grupos descritos junto com um aspecto, modalidade ou exemplo específico da invenção não devem ser entendidos como aplicáveis e qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo descrito no presente documento, salvo se incompatível com os mesmos.

Uma modalidade da invenção agora será descrita para exemplo apenas e com referência às seguintes figuras:

Figura 1 Um construto de gene huKMP11_HASPB_consenso sintético. (A) Diagrama esquemático de huKMP11_HASPB_consenso. (B) Lisatos de proteína de células P815 transduzidas o/n com os construtos virais indicados foram examinados para expressão de proteína por SDS-PAGE e imunoblotting com antisoros específicos KMP11 e HASPB. Lisatos de proteína de parasitas *L.donovani* ou KMP recombinante foram usados como controles positivos;

Figura 2 Respostas de antígeno específico a proteínas KMP11 e HASPB. (A) Diagrama esquemático de projeto de pepset de peptídeos sobrepostos. Camundongos (B e C) Naïve BALB/c foram vacinados s.c com 108 PFU (B) ou 107 PFU (C) Ad5- huKMP11_HASPB_consenso. Respostas de peptídeo específico a proteínas KMP1 1 e HASPB foram analisadas por ELISPOT. Esplenócitos ($2,5 \times 10^5$) foram re-estimulados com pepsets colocados em recipiente (10ug/ml). Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes usando esplenócitos colocados em recipiente de 2 camundongos vacinados. (D) Um diagrama esquemático de huKMP11_HASPB_consenso com regiões identificadas de uma seqüência que induz células CD8+ T ativadas indicadas por barras pretas;

Figura 3 Mapeamento de epítomos finos de epítomos KMP11 e HASPB.

Camundongos Naïve BALB/c foram vacinados s.c com 108 PFU Ad5-huKMP11_HASPB_consenso e 10 dias após esplenócitos foram usados em uma análise ELISPOT de IFN γ . Esplenócitos foram reestimulados com tubos de peptídeos individuais usados para gerar recipiente de HASPB nº 41 (A) e
5 recipiente de KMP11 nº 5 (B).

A seqüência de peptídeos também é mostrada para cada pepset individual testado com epítomos deduzidos mostrados no texto em vermelho;

Figura 4 Verificação de seqüências de peptídeos previstas. Camundongos Naïve BALB/c foram vacinados s.c com 109 PFU Ad5-huKMP11_HASPB_consenso e 10 dias depois esplenócitos (5x10⁶/poço) foram
10 re-estimulados com pepsets colocados em recipiente ou peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos previstos. As amostras foram re-estimuladas por 7 horas e Brefeldin A foi adicionado pelas últimas 4 horas de cultura. Após marcação de superfície as amostras de CD3 e CD8 foram marcadas para anticorpos de citosina intracelular para IFN γ e IL-10 (A). (B) Em um experimento
15 semelhante células CD8⁺ T esplênicas de camundongos vacinados foram re-estimuladas com peptídeo HASPB, marcadas em superfície para CD3 e CD8, e em seguida marcadas para citosinas intracelulares. Gráficos ilustram a contribuição relativa das diferentes populações de célula citosina⁺ T. Células
20 CD8⁺ T HASPB-específicas foram inicialmente separadas em subconjuntos IFN γ .+TNF-ou IFN γ .+TNF⁺ e contribuições relativas de IL-2 e IL-10 foram examinadas em cada subconjunto;

Figura5 Vacinação intradérmica induz respostas imunes potentes a huKMP11_HASPB_consenso. (A) Camundongos Naïve BALB/c foram vacinados
25 s.c ou i.d com Ad5-huKMP11_HASPB_consenso (em 109 PFU ou 108 PFU). Os camundongos também foram vacinados s.c com Ad5-huKMP11_HASPB_consenso (108 PFU). Em 10 dias após a vacinação os esplenócitos (2,5x 10⁵) foram usados em análise ELISPOT de IFN γ . As células foram reestimuladas com pepsets colocados em recipiente (10ug/ml). (B) Imagens
30 representativas de poços positivos são mostradas em comparação a controles estimulados. Os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes usando esplenócitos colocados em recipiente de 2 camundongos vacinados. (C) Microscopia estéreo fluorescente foi usada para identificar localização celular de Ad5-GFP após vacinação s.c ou i.d. Camundongos Naïve BALB/c foram
35 vacinados s.c ou i.d com Ad-GFP por 24 horas e LN de drenagem local e baços foram examinados para expressão de GFP. LN e baços de camundongos não

vacinados foram usados como controles;

Figura 6 Falta de resposta de células CD8+ T de antígeno específico para Ad5- huKMP11_HASPB_consenso em camundongos infectados por *L. donovani*. (A) Camundongos BALB/c foram infectados com *L. donovani* (3×10^7) e em d31 células CD8+ T esplênicas foram analisadas para respostas a huKMP11_HASPB_consenso usando pepsets colocados em recipiente e análise ELISPOT. (B) Respostas de células CD8+ T em camundongos BALB/c infectados por d21 imunizados com Ad5- huKMP11_HASPB_consenso foram avaliadas por marcação com citosina intracelular usando GGPKEGENL (contido em huKMP11_HASPB_consenso) ou DGPKEGENL (conforme encontrado no LV9 de desafio isolado). (C) Camundongos BALB/c infectados por 7 dias com *L. donovani* foram testados para respostas de células CD8+ T usando peptídeos de KMP e HASPB específicos;

Figura 7 Comparação da eficácia de vacinação terapêutica usando Ad5- huKMP11_HASPB_consenso pela rota de administração. (A) Diagrama esquemático de estratégia de vacinação terapêutica. (B e C) Camundongos BALB/c foram infectados com *L. donovani* e em d21, vacinados com 109 PFU Ad5-huKMP11_HASPB_consenso por rota s. c ou i.d. A carga de parasitas esplênicos (B) e resposta de células T a peptídeos colocados em recipiente (C) foi determinada em camundongos em d31 (d10 após vacinação). Camundongos individuais são representados graficamente em (B).

Figura 8 Vacinação terapêutica usando Ad5-huKMP11_HASPB_consenso. Camundongos BALB/c foram infectados com *L. donovani* e em d21 p.i., imunizados com 109 PFU Ad5- huKMP11_HASPB_consenso pela rota i.d. A carga de parasitas (A) e respostas de células CD8+ T foram avaliadas por análise ELISPOT (B). As respostas de peptídeos específicos para epítomos dominantes KMP e HASPB também foram avaliadas por marcação com citosina intracelular e apresentadas como frequência de células CD8+T de resposta (C) e número absoluto de células CD8+ T específicas por baço (D). Camundongos individuais são representados graficamente.

Figura 9 Vacinação terapêutica usando Ad5-huKMP11_HASPB_consenso. Dados de proteção de experimentos mostrados nas Figuras 7 e 8 foram combinados para alcançar uma estimativa geral da eficácia de vacinação terapêutica usando Ad5- huKMP11_HASPB_consenso ($n=15/16$ camundongos por grupo). A carga média de parasitas $\pm$ SE é indicada.

A Figura 10a é a estrutura de genes de huHASPB e a sequência de

nucleotídeos do gene de fusão HASPB sintético 1 (huHASPb_consensu); A Figura 10b é a sequência de aminoácidos;

A Figura 11a é a estrutura de genes de huHASPb que mostra todas as sequências repetidas e a sequência de nucleotídeos do gene de fusão HASPB sintético 2 (huHASPb_allREPEATS); A Figura 11b é a sequência de aminoácidos;

A Figura 12a é a sequência de nucleotídeos de fusão híbrida do gene de fusão HASPB 1 e KMP11 (huKMP11_HASPb_consensu); A Figura 12b é a sequência de aminoácidos;

A Figura 13a é a sequência de nucleotídeos de fusão híbrida do gene de fusão HASPB 2 e KMP11 (huKMP11_HASPb_allREPEATS); A Figura 13b é a sequência de aminoácidos; e

A Figura 14 ilustra transfecção de adenovírus e expressão do gene de fusão HASPB.

Materiais e Métodos

Sequências de Genes

As sequências de HASPB derivadas da literatura especializada, banco de dados Gene DB, de trabalho não publicado (D. F. Smith) e de isolados de *L. donovani* passados e atuais de Bihar (fornecido por P. Walden) foram analisadas e as diversas repetições catalogadas. 19 repetições para o complexo de *L. donovani* / *infantum* foram identificadas, com estas unidades de repetição de 12 a 14 aminoácidos mostrando variação extensa em seus terminais C.

Genes HASPB sintéticos foram designados para codificar repetições conhecidas para *L. donovani* e *L. chagasi* e ainda i) para preservar o número relativo de repetições que estão presentes mais de uma vez em cada isolado, para maximizar preservação de estrutura de proteínas (= huHASPb_consensu; Figure 1) ou ii) para preservar a variação juncional que surge da ordem de repetições encontrada em HASPB em isolados de parasitas. Aqui, todas as repetições são incluídas e embaralhadas de forma a preservar a variação de sequências juncional (= huHASPb_allREPEATS; Figura 2)

A sequência de aminoácidos resultante foi “traduzida de volta” usando o software Genedesigner DNA2.0 com códons otimizados para expressão humana, selecionados para minimizar estruturas de DNA repetidas e, de forma importante, manualmente tratados. Todos os construtos foram flanqueados com locais de enzimas de restrição (para digestão e clonagem e vetores adequados) bem como com uma sequência Kozak (5' do ATG) e uma sequência de poliadenilação derivada de SV40 (31 de códon de terminação) para melhorar o início da tradução

e facilitar processamento de mRNA respectivamente.

Os genes de fusão também foram projetados (Figura 12 e 13) usando a sequência de KMP11-2 sintética (KMPII-2 LinJ35_ versão V3.2250 GeneDB Data 01-09-2009) ligando esta parte acima dos genes HASPB sintéticos e ligando as
5 sequências com uma denominada sequência 2a derivada de um TetraVirus TVA (Martin Ryan, St. Andrews University pers. Comm.). Todos os genes de interesse (GOI) foram sintetizados personalizadas por uma contratada comercial e clonados no vetor plasmidial pMA.

GOI de produção adenoviral em pMA foram clonados em um vetor
10 recíproco adenoviral e em seguida em um vetor de estrutura principal adenoviral de E1/E3. O empacotamento viral foi realizado em células HEK 293 e estoques virais primários foram gerados. O estoque viral primário foi testado para a capacidade de transdução células de mastocitomas P815, para verificar a integridade de expressão do GOI. Os vírus para estados de vacinação foram
15 produzidos após ampliação em larga escala de células cultivadas, seguidos de 2 x de purificação e dessalinização de CsCl. A titulação viral foi realizada por PFU e VP. GOI pode ser inserido em humano (ex. Ad5, Ad35, Ad28), primata não-humano (ex. ChAd63) ou adenovírus simiano.

Estudos de imunogenicidade

20 Para testar a imunogenicidade de vacinas adenovirais que expressam GOI, os camundongos C57BL/6 ou BALB/c foram imunizados s.c. e/ou i.p. e /ou i.m com doses variadas (10⁶ - 10⁸ pfu) de vírus controle e recombinante, apenas uma vez ou com uma injeção de reforço através da mesma rota ou uma rota alternativa 7 a 14 dias depois.

25 7 dias após a última injeção, o sangue da cauda foi coletado para determinar a frequência de células de tetrâmeros+ CD8+ T, usando tetrâmeros de peptídeos com base nos epítomos dominantes do GOI (Rowe et al J. Virol. 2009. 83:1555-1562)

Para determinar resposta de memória in vitro, célula de baço e suspensões
30 de LN foram preparadas usando peneiras de malha de náilon e esplenócitos totais/ células LN foram re-estimuladas com peptídeos sintéticos ou linhagens celulares singenéticas (ex. P815, EL-4) expressando GOI. Para avaliação de IFN γ secretado, os sobrenadantes da cultura foram recuperados após 24 horas e analisados usando análise ELISA de acordo com protocolos padrão. Para
35 avaliação de produção de citosina por citometria de fluxo intracelular, os esplenócitos ou células LN foram incubados durante a noite com ou sem

peptídeos/linhagens celulares transfectadas e em seguida cultivados em Brefeldin A por 3 horas antes de marcação em superfície de células para CD3 e CD4 ou CD3 e CD8. As células foram em seguida fixadas e permeabilizadas usando reagentes Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) e marcadas usando anti-IFN- γ Ab conjugado (BD Pharmingen). As amostras foram analisadas usando um citômetro de fluxo CyAan (Beckman Coulter).

Para determinar a atividade de CTL in vivo contra o GOI, células baço singenéticas foram marcadas com diéster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) em uma dose alta (20 μ M ; CFSE alto) ou baixa (1 μ M; CFSE baixo). As células de CFSE alto foram pulsadas com peptídeo por 30 minutos a 37 °C, misturadas com células de CFSE baixo não pulsadas e em seguida co-injetadas (4 $\times$ 10⁷ células i.v.) em camundongos anteriormente imunizados com adenovírus recombinantes que expressam GOI . Em alguns casos, os camundongos foram injetados com linhagens celulares de tumor singenéticas marcadas com CFSE alto (P815 ou EL4) transfectadas com GOI , misturadas com transfectantes controle marcados com CFSE baixo. 20 horas após a transferência, as células transferidas com recuperadas a partir do baço, fixadas e analisadas por citometria de fluxo. A percentagem de lise específica foi determinada como: $1 - [(\%CFSE \text{ alto infectado} - \%CFSE \text{ baixo infectado}) / (\%CFSE \text{ alto naíve} - \%CFSE \text{ baixo naíve})] * 100$. (Resende et al Vaccine 2008. 26:4585- 4593)

Vacinação contra Leishmania donovani

Para testar a eficácia de vetores adenovirais que expressam GOI como vacinas profiláticas, os camundongos primeiro foram imunizados conforme acima. 7-28 dias após a última injeção, os camundongos foram desafiados com amastigotas de donovani de 2-5 $\times$ 10⁷ L, preparadas a partir dos baços de camundongos RAG^{""} infectados. Os camundongos foram eliminados no dia 14 - 56 após o desafio e as cargas de parasitas no baço e fígado determinadas a partir de esfregaços de impressão de tecido marcados com Giemsa ou por PCR quantitativa (Depledge et al submitted; Polley et al Infect. Immun. 2006. 74:773-776; Rowe et al J. Virol. 2009. 83:1555-1562). Para vacinação terapêutica, os camundongos foram primeiros infectados com L. donovani, conforme acima, e em seguida no dia 14-28 após a infecção, injetados com adenovírus (106-108 pfu) expressando GOI, usando a rota Lm., Lp., ou s.c.. In some cases, a boost was given 7-14 days later. Mice were killed 7 days after the last injection and parasite burden determined as above.

Mapeamento de epítomos de GOI

GOI foram mapeados para epítomos de células CD8+ T usando um PepSet truncado (Mimotopes Inc) com base no ORF traduzido previsto e onde cada peptídeo 11 mer nominal foi apresentado por uma mistura equimolar dos quatro peptídeos de terminal C compreendendo os peptídeos 8mer, 9mer, 10mer e 11 mer (Roederer and Koup. J. Immunol. Methods 2003. 274:221). Positive peptides were identified by IFN γ ELISPOT assay of re-stimulated baço cells from immunised mice (above), according to standard protocols (Resende et al. Vaccine 2008. 26:4585-4593)

Exemplo 1

A seqüência de huHASPb-consenso sintética foi clonada em um vetor de Adenovírus serotipo 5 (Ad5) e sobrenadante viral foi usado para infectar células de mastocitomas PB15 murinas. A expressão do produto de gene expresso huHASPb_consenso foi avaliada 18 horas depois por imunofluorescência, usando um anticorpo de coelho anti-HASPb policlonal. (Figura 14a-d) Marcação de anticorpo em células representativas transduzidas com Ad5-huHASPb_consenso; (Figura 14e-f) Marcação de anticorpo em células controle transduzidas com Ad5-huKMP11.

Exemplo 2

Polimorfismos em KMP11 e HASPB e mapeamento de epítomos.

As seqüências de KMP11 obtidas a partir de isolados de Bihar seqüenciados até então são idênticas, e diferem em apenas três aminoácidos das seqüências do banco de dados, argumentando em favor de uma população de parasitas homogênea na área alvo. Em contrapartida, HASPB é conhecida por apresentar trechos de repetições de comprimento de 11 a 14 aminoácidos e seqüências de seis isolados examinados prevêm variantes de isolados específicos de proteínas HASPB com diferentes números, composições e ordens destas repetições e diversas trocas de aminoácidos únicos. A extensão destas variações, conforme analisada para este projeto é resumida na Tabela I. Este polimorfismo de seqüências é provável de gerar diversos epítomos de célula T e re-iteração de repetições idênticas podem aumentar a abundância relativa de epítomos codificados nestas repetições. Coletivamente, estes dados sugerem que embora a seqüência de KMP nativo seja provável de ser amplamente representativa das cepas de parasitas em circulação na população alvo, este não seria o caso para qualquer variante de HASPB única. Portanto, projetamos um gene de HASPB sintético que compreende os terminais N e C conservados, limitando uma região que compreende 10 das 17 repetições diferentes (repetição

marcada 1 , 2, 3 etc) que identificamos até então em *Leishmania* spp. associada à doença visceral (Tabela I). A sequência e composição das 10 unidades de repetição foram escolhidas para i) preservar a ordem relativa das repetições que estão presentes em mais de apenas um isolado; ii) conservar algumas das re-
 5 iterações de repetições encontradas em isolados naturais (ex. cadeias de repetição 2); e iii) para manter o comprimento geral de proteínas àquele encontrado em isolados naturais. O último foi considerado importante dada a estrutura peculiar da molécula de HASPB e falta de informações preditivas sobre a forma como uma proteína estendida pode dobrar. Este gene de HASPB único
 10 foi denominado HASPB_consenso. (Figura 10)

Exemplo 3

Construção de genes de vacina e vetores virais

Para expressar tanto KMP11 como HASPB de um vetor único, optamos por fazer uso da sequência 2A derivada do vírus tetravírus TaV
 15 (RAEGRGSLTCDVEENPG) fornecido por Prof. M. Ryan (http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/2A_2Alike.pdf). As seqüências 2A codificam trechos de 20 a 30 aminoácidos e podem ser usadas para ligar dois ou mais genes codificadores de proteínas juntos em uma única estrutura de leitura aberta longa que permite que múltiplos genes sejam expressos sob o controle de um único
 20 promotor (ou importante em nosso contexto a partir de um local de integração único em um único vetor de vacina) (de Felipe et al Gene Therapy 1999. 6:198-208). Durante a tradução a poliproteína é processada na seqüência 2A resultando em cada proteína sendo expressa como um único produto de clivagem. Assim, esperamos que KMP11 e HASPB sejam expressos como proteínas individuais em
 25 vez de uma proteína de fusão. Esta estratégia evita a geração de neo-epítomos entre proteínas e também permite transporte de proteínas independentes através do maquinário de processamento de antígenos de células dendríticas e macrófagos. As seqüências 2A são de domínio público, tendo recentemente sido usadas em uma variedade de tecnologias (catalogadas em [http://www.st-](http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/page10.htm)
 30 [andrews.ac.uk/ryanlab/page10.htm](http://www.st-andrews.ac.uk/ryanlab/page10.htm)) e foram aprovadas para uso em terapia genética humana pela FDA (Jones, S., et al Human Gene Therapy 2009. 20:630-640).

A seqüência final de aminoácidos foi traduzida de volta usando o software Gene Designer DNA2.0 que usa códons otimizados para expressão humana
 35 (designada 'hu') e selecionada para minimizar estruturas de repetição de DNA. O construto foi flanqueado pela seqüência Kozak 5' de ATG e uma seqüência de

poliadenilação derivada de SV40 para melhorar o início da tradução e permitir processamento de mRNA, respectivamente. O gene sintético final é descrito na Figura 1A e foi sintetizado sob contrato por Geneart. O gene huKMP11_HASPB_consenso sintético (bem como genes sintéticos que codificam apenas huKMP11 ou huHASPB_consenso), foi inserido em um vetor viral Ad5 deletado por E1/E3 por Vector Biolabs Inc. e lotes experimentais de partículas virais de -5×10^{12} (vp) foram fornecidos. A razão de vp para unidade formadora de placas (pfu) dos vírus foi -20-25:1. As doses virais para todos os experimentos são expressar em termos de pfu. Para confirmar a expressão de proteína a partir destes vírus, transduzimos o mastocitoma murino P815 com vírus em um MOI de 100:1 e 24-36h depois, foi realizada lise celular seguida de análise western blot, usando anti-soros anti-KMP11 e anti-HASPB (Figura 1 B e C). As amostras controle incluíram células P815 não transduzidas bem como promastigotas metacíclicas de *L. donovani* (que expressam altamente HASPB) ou KMP11 recombinante (produzido em *E. coli*). Deve ser observado que os níveis de expressão de HASPB foram de alguma forma inferiores em células transduzidas com bi-proteína que codifica Ad5-huKMP11_HASPB_consenso em comparação a células transduzidas com Ad5- huHASPB_consenso, sugerindo que pode haver expressão menos eficientes de HASPB colocado após a sequência de clivagem 2A. No entanto, isto não foi mais detalhadamente investigado e também pode ser o resultado de níveis diferentes de transdução viral entre as duas amostras. Estes dados confirmam, no entanto, que os genes sintéticos podem surgir em células de mamíferos às proteínas KMP11 e HASPB de respectivo comprimento completo.

Exemplo 4 Imunogenicidade e mapeamento de epítomos de produtos de genes de vacina sintética

Para determinar imunogenicidade e identificar possíveis epítomos de célula CD8+ T nas proteínas de vacina, usamos uma abordagem de epítomos sintéticos. Um Pepset® truncado (Mimotopes, Inc.) de peptídeos 11 mer sobrepostos por 10 aminoácidos foi gerado para toda a sequência codificadora de huKMP11_HASPB_consenso (incluindo a sequência 2A), e composta de 444 tubos de peptídeos individuais (cada tubo contendo um 11mer mais seus 10, 9 e 8 mers truncados respectivos; Figura 2A). Para varredura inicial, geramos recipientes de 10 tubos, abrangendo assim toda a sequência de proteínas em segmentos de 20 aminoácidos. Camundongos BALB/c foram imunizados com 107 - 109 pfu de Ad5- huKMP11_HASPB_consenso pela rota subcutânea no dia 10 após a imunização, as células baço foram removidas para análise IFN. ELISPOT

(Mabtech, Sweden). Rapidamente, o total de células de baço (5×10^5 por poço em placas de ELISPOT pré-revestidas) foi re-estimulado durante a noite com recipientes de peptídeos ($10 \mu\text{g/ml}$), removido por lavagem e em seguida as placas foram desenvolvidas usando mAb de detecção de IFN. ELISPOTS foram

5 contados manualmente sob um microscópio estéreo. Conforme mostrado nas Figuras 2B e 2C, a imunização causou uma resposta robusta e dependente de dose para Ad5-huKMP11_HASPB_consenso, que foi refletida pelo reconhecimento direcionado de uma série de regiões de ambos KMP11 e HASPB. Em ambas as doses imunizantes de pfu 107 e 108, um par consecutivo de

10 recipientes de peptídeos em KMP11, representando um trecho de 40 aminoácidos (KMP38-67) foi reconhecido por camundongos BALB/c sob este regime de imunização. Para HASPB, o reconhecimento foi direcionado a uma região de 20mer única dentro do terminal N conservado (HASPBN16-35), um trecho de 20mer abrangendo a última região de repetição e o terminal C conservado (R177

15 -C12) e a um trecho de 40 aminoácidos que abrangeu 3 repetições (R2.28 - R3.111). Um reconhecimento fraco de outra região de repetição com imunização de dose baixa também foi observado (R2.111 - R2.34). A localização das regiões dominantes mapeadas sobre a sequência de antígeno de vacina sintética é mostrada na Figura 2D. Resultados semelhantes foram vistos usando uma dose

20 de imunização de 109 pfu, embora a intensidade da resposta dado o número de células baço colocadas em placas tenha tornado a quantificação difícil (dados não mostrados). Deve ser observado que não houve evidências a partir destes estudos em camundongos de que a sequência 2A foi reconhecida por células CD8⁺ T, sozinhas ou como parte de um neo-epítipo com sequência de KMP11

25 ou HASPB.

Exemplo 5

Em seguida prosseguimos para mapeamento fino das duas regiões mais imunodominantes para fornecer peptídeos definidos para monitoramento imune subsequente e também gerar potencialmente sondas de tetrâmeros. Conforme

30 mostrado na Figura 3A1, a re-estimulação com os tubos de 10 peptídeos que compreenderam o recipiente 41 imediatamente identificou 3 tubos individuais contendo peptídeos truncados reconhecidos nesta análise (peptídeos 405, 406 e 407). A procura destas sequências de peptídeos para sequências de 8, 9 ou 10 mer compartilhadas em todos os três tubos revelou apenas uma sequência de 9

35 mer possível (GGPKEGENL) como um epítipo putativo para reconhecimento de células CD8⁺ T. Esta estratégia de mapeamento fino não foi clara para os

peptídeos KMP11 representados pelo recipiente 5, mas, contudo, uma forte sequência de peptídeos candidata foi identificada (HYEKFERMI; Figura 3B). O potencial como epítomos de classe I em camundongos BALB/c foi confirmado usando uma variedade de algoritmos (Syfpeithi, Rankpep, PREDBALB/c e Bimas). Estes peptídeos foram subsquentemente diretamente sintetizados e comparados em sua capacidade de recordar respostas de IFN de células CD8+ T com o recipiente de peptídeos original por citometria de fluxo intracelular. Conforme mostrado na Figura 4A, os dois peptídeos fielmente recordaram resposta de células CD8+ T ao mesmo grau que os recipientes de peptídeos a partir dos quais foram identificados. Além disso, poderíamos afirmar por citometria de fluxo multi-parâmetros que a imunização com huKMP11_HASPB_consenso induziu respostas de células CD8+ T polifuncionais, incluindo aquelas que produzem IFN., TNF e IL-2 (Figura 4B), uma combinação de citosinas que foi implicada em proteção no modelo murino de infecção principal por L. (Darrah et al Nat Med. 2007. 13:843-50). Estes dados confirmam GGPKEGENL e HYEKFERMI como epítomos de células CD8+ T H2d-restritas reconhecidos após vacinação de camundongos naïve BALB/c com Ad5-huKMP11_HASPB_consenso. De forma importante, os níveis de resposta de células CD8+ T foram da mesma ordem de magnitude que aqueles relatados para vacinação de dose única em outros sistemas (ex. ME-TRAP de malária; Reyes-Sandoval et al Eur J Immunol. 2008. 38:732-41) e melhor do que os relatados para reforço primário homólogo com Ad5-L. donovani A2 (Resende et al Vaccine. 2008 26:4585-93).

Exemplo 6

Em seguida foi avaliada a resposta a Ad5-huKMP11_HASPB_consenso comparando imunização subcutânea vs. intradérmica. Conforme mostrado na Figura 5A, a imunização intradérmica induziu uma resposta de células CD8+ T mais forte, conforme medido pelos números absolutos dos ELISPOTs registrados, embora tenha sido mais direcionado a epítomos no HASPB em dose alta em comparação à resposta mais ampla observada usando imunização subcutânea. Embora difícil de quantificar, o tamanho da mancha após imunização intradérmica pareceu maior do que aquele obtido após imunização subcutânea, sugerindo uma potência maior à resposta de IFN. (Figura 5B). Também avaliamos a distribuição de Ad5-GFP in vivo após administração através de três rotas alternativas. Como mostrado na Figura 5C, após imunização subcutânea na base da cauda, o vírus foi distribuído em ambos LN inguinais (e em ampliação superior poderia ser visto em macrófagos e DC no sino subcapsular e região paracortical do LN; dados não

mostrados). Em contrapartida e conforme esperado, a imunização intradérmica no coxim plantar causou distribuição assimétrica de vírus nos LNs popliteais, com apenas o nodo drenando o local de injeção demonstrado positivo para vírus. Interessantemente, após imunização do coxim plantar, alguns vírus foram detectados no baço e isto foi compatível com um grau de esplenomegalia. Não obstante, é difícil equiparar estes resultados ao resultado provável em humanos. Por exemplo, enquanto respostas induzidas por Ad são maiores em humanos após entrega intramuscular do que entrega intradérmica, uma situação semelhante não é vista em camundongos (Hill, comunicação pessoal).

Exemplo 7

Em seguida perguntamos se camundongos infectados apenas com *L. donovani* geraram respostas a KMP11 ou HASPB. Em experimentos piloto, observamos que análises ELISPOT foram difíceis de interpretar ao usar células do baço completas, devido ao nível elevado de IFN. espontâneo produzido em camundongos infectados (a partir de células CD4+ e CD8+ T, células NK e NKT). Portanto, para avaliar respostas de memória de CD8+ de peptídeos específicos, primeiros purificamos células CD8+ T com MACS a partir de camundongos infectados e em seguida usamos células baço não infectadas como uma fonte de APC. Como mostrado na Figura 6A, falhamos em identificar qualquer resposta de memória de célula CD8+ T para KMP11 ou HASPB em camundongos infectados por 31 dias com *L. donovani*, ao usar o conjunto de peptídeos inteiro abrangendo huKMP11_HASPB_consenso. Este resultado foi surpreendente visto que este gene sintético codifica KMP11 nativo, conforme encontrado em *L. donovani*, terminais N e C conservados HASPB, e 'repetição 3' da cepa de laboratório de *L. donovani* usada nestas infecções experimentais (cepa LV9). Uma explicação possível para a perda ou ausência de reconhecimento do epítipo de terminal C de HASPB dominante foi que em LV9, a posição putativa 1 deste 9mer continha uma substituição de G - D em comparação àquela codificada por huKMP11_HASPB_consenso. Embora a posição 1 não tenha sido mostrada de modo a influenciar o reconhecimento por células T H2d-restritas, sintetizamos o peptídeo DGPKEGENL correspondente e comparamos este com o epítipo GGPKEGENL para reconhecimento após vacinação e após infecção. Como mostrado na Figura 6B, DGPKEGENL foi bem reconhecido por células CD8+ T recuperadas de camundongos primados por vacinação com Ad5-huKMP11_HASPB_consenso (contendo GGPKEGENL). Semelhantemente, usar este peptídeo para recordar respostas em camundongos infectados por *L.*

donovani também falhou em identificar a presença de células CD8+ T reagentes a HASPB (dados não mostrados). Concluímos a partir destes dados que camundongos infectados com *L. donovani* não tem respostas de memória de células CD8+ T detectáveis para KMP11 ou HASPB. Para determinar se isto foi devido a exaustão clonal, supressão ou falta de *priming*, examinamos a resposta inicial para huKMP11_HASPB_consenso (Figura 6C). Até mesmo camundongos infectados por apenas 7 dias não conseguiram responder a qualquer um dos recipientes de peptídeos. Portanto, acreditamos que tanto KMP11 como HASPB representam antígenos fracamente imunogênicos insuficientemente primados durante infecção experimental inicial com *L. donovani*, argüindo fortemente em favor do uso de um vetor adenoviral, dado sua forte superioridade não desafiada em *priming* de respostas de células CD8+ T.

Exemplo 8

Eficácia protetora de Ad5-huKMP11_HASPB_consenso.

Com base nos dados acima, prosseguimos para a avaliação da eficácia de Ad5- huKMP11_HASPB_consenso como uma intervenção terapêutica contra VL experimental. Modelos de camundongo de VL mostram diferenças específicas de órgãos no resultado da doença. Enquanto o fígado é capaz de resolver infecção, o baço não consegue fazê-lo e é **caracterizado** por esplenomegalia massiva com ruptura associada à arquitetura do tecido linfóide local (Kaye et al Immunol Rev. 2004. 201 :239-53). Escolhemos estudar o impacto de vacinação terapêutica em carga de parasitas esplênicos no ponto de tempo em que a mesma era crescente em sua taxa máxima e em que a quebra microarquitetural de tecido já havia sido iniciada. Adotamos esta abordagem visto que esta fornece o teste mais rigoroso para intervenção. Na clínica, também é provável, visto que foi feito para estudos imunológicos recentes (Nylen et al J Exp Med. 2007. 204:805-17) que tentativas clínicas iniciais de vacinas terapêuticas serão conduzidas em pacientes com diagnóstico inicial. Portanto, vacinamos camundongos 21 dias após infecção com *L. donovani*, e avaliamos carga de parasitas esplênicos 10 dias depois. Sob condições semelhantes, o baço é conhecido por ser relativamente refratário ao tratamento com drogas. Por exemplo, usando uma variedade de isolados clínicos e laboratoriais de *L. donovani*, Carter e colegas relataram que a administração de stibogluconato de sódio (300mg/kg Sbv i.v.) resultou em apenas 1 1-52% de supressão de carga de parasitas esplênicos (Carter et al Antimicrob. Agents Chemother. 2001. 45:3555-3559). Semelhantemente, mesmo doses múltiplas a 8mg/kg de Ambisome (amfotericina lipossomal B) falharam em realizar redução >

80% em carga de parasitas esplênicos (Mullen et al Antimicrob. Agents Chemother 1997. 41 : 2089-2092). Droga parcial de fato liberação de carga de parasitas esplênicos é geralmente seguida de recrudescência rápida após terminação da terapia com drogas (Kaye, não publicado). Com base nestes e em dados semelhantes, definimos nossa referência para vacinação terapêutica de dose única eficaz como uma supressão de crescimento de parasitas esplênicos de > 50%. Com base nos dados históricos que indicam um aumento em carga de parasitas de aproximadamente 3 vezes a partir do dia 21 - 28/31 e um desvio padrão de aproximadamente 25% da carga média de parasitas (expressa como Unidades de Leishman Donovan) em d28/31 , calculamos que com n=8 camundongos por grupo, teríamos 90% de energia para detectar uma redução de carga de parasitas no dia 28/31 de 50% com um nível de significância de 0,05.

O cronograma de vacinação é resumido na Figura 7A. Primeiro comparamos a imunização através da rota intradérmica e subcutânea. Como mostrado na Figura 7B, a imunização subcutânea com Ad5-GFP (um vírus controle) ou Ad5- huKMP11_HASPB_consenso falhou em fornecer qualquer proteção a camundongos contra infecção esplênica progressiva com *L. donovani*. Em contrapartida, imunização intradérmica com Ad5- huKMP11_HASPB_consenso foi significativamente protetora, suprimindo crescimento de parasitas esplênicos em $48 \pm 10\%$ ($p=0,008$). Ad5-GFP controle não induziu um nível significativo de proteção ($37 \pm 15\%$), embora houvesse alguma sugestão de uma resposta protetora independente de antígeno fraca.

Para determinar se a vacinação tinha primado KMP11 e/ou células CD8+ T HASPB-específicas nestes camundongos infectados, conduzimos análises ELISPOT usando células CD8+ T purificadas de camundongos infectados (com células baço normais agindo como APC). Como mostrado na Figura 7C, camundongos infectados d31 vacinados 10 dias antes com Ad5-GFP não mostraram qualquer resposta a qualquer um dos recipientes de peptídeos que abrangiam huKMP11_HASPB_consenso. Em contrapartida, camundongos vacinados tiveram respostas satisfatórias para HASPB, equivalentes a ou melhores do que aquelas observadas em camundongos naïve que foram vacinados com huKMP11 HASPB consenso.

(Figura 2). Deve ser observado que embora a eficácia protetora de Ad5- huKMP11_HASPB_consenso fosse dependente da rota de imunização, ambas as rotas induziram níveis semelhantes de resposta de células CD8+ T aos epítomos de HASPB. Surpreendentemente, dado o *priming* claro da resposta a HASPB, não

encontramos nenhuma resposta de memória aos epítomos KMP11, conforme medido por ELISPOT, em camundongos infectados vacinados, independente da rota de imunização, sugerindo outras restrições de reconhecimento, expansão ou sobrevivência de células CD8+ T reconhecendo este antígeno.

5 Exemplo 9

Em seguida conduzimos um segundo experimento de vacinação usando imunização intradérmica apenas. Neste experimento (Figura 8A), o controle de carga de parasitas estimulado como resultado de vacinação com Ad5-huKMP11_HASPB_consenso foi quase 90% ($p=0,0004$) em comparação a camundongos não vacinados. Novamente, algum nível de proteção de espectador, provavelmente mediada por uma resposta de IFN do tipo I antiviral, foi observado usando Ad5-GFP ($p=0,045$). Novamente, encontramos *priming* satisfatório de respostas de células CD8+ T a HASPB, mas falta de *priming* contra KMP11, conforme determinado por ELISPOT (Figura 8B). Através de critometria de fluxo intracelular (Figura 8C), uma resposta de KMP fraca poderia ser identificada, sendo equiparada a células CD8+ T -105 KMPHYEKFERMi-células específicas por baço em camundongos infectados vacinados. Em contrapartida, baços nestes camundongos continham ~ 4-vezes mais células CD8+ T HASPBGGPKEGENL específicas (Figura 8D).

20 Exemplo 10

Finalmente para derivar uma estimativa da eficácia protetora geral de Ad5-huKMP11_HASPB_consenso, reunidos os dados dos dois experimentos descritos acima. Como mostrado na Figura 9, nossa estimativa geral da eficácia de vacinação terapêutica usando Ad5-huKMP11_HASPB_consenso, administrado como um "prime" único e medido como supressão de crescimento de parasitas de baço, foi $74 \pm 8.5\%$ ($p=0.001$ vs. camundongos não vacinados). Usando 95% de CI inferior da carga média de parasitas de camundongos não vacinados como um valor de corte para proteção, 93% (14/15) de camundongos vacinados intradermicamente com 109 pfu de Ad5-huKMP11_HASPB_consenso responderam com carga de parasitas reduzida, em comparação a 68% (11/16) de camundongos vacinados com a mesma dose de AD5-GFP. Ad5-huKMP11_HASPB_consenso, assim, constitui uma intervenção terapêutica eficaz neste modelo experimental de infecção.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucléico, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em:

i) uma molécula de ácido nucléico que consiste na sequência de nucleotídeos conforme estabelecida na SEQ ID NO 5;

ii) uma molécula de ácido nucléico que consiste na sequência de nucleotídeos conforme estabelecida na SEQ ID NO 12; e

iii) uma molécula de ácido nucléico que compreende sequências de nucleotídeos que são degeneradas como resultado do código genético à sequência de nucleotídeos definida em (i) e (ii) e codifica uma sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO 6.

2. Molécula de ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a molécula compreende ou consiste em uma sequência de nucleotídeos conforme estabelecida na SEQ ID NO 5.

3. Polipeptídeo, **caracterizado** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos conforme estabelecida na SEQ ID NO 6.

4. Cassete de transcrição, **caracterizado** pelo fato de que compreende: uma molécula de ácido nucléico conforme definida na reivindicação 1 ou 2 operacionalmente ligada a um promotor adaptado para transcrição da molécula de ácido nucléico associada ao mesmo.

5. Cassete de transcrição, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que tal promotor é um promotor constitutivo, regulável, induzível e/ou específico de tecido/célula.

6. Cassete de transcrição, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizado** pelo fato de que tal promotor é um promotor específico de músculo esquelético.

7. Vetor, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico conforme definida na reivindicação 1 ou 2 ou conforme qualquer uma das reivindicações 4 a 6.

8. Composição de vacina, **caracterizada** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico, ou parte da mesma, conforme definida na reivindicação 1 ou 2 ou um vetor conforme definido na reivindicação 7, e um transportador e/ou opcionalmente um adjuvante.

9. Composição de vacina, **caracterizada** pelo fato de que compreende um polipeptídeo, ou parte do mesmo, conforme definido na reivindicação 3.

10. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que tal adjuvante é selecionado a partir do grupo que consiste de: citosinas selecionadas a partir do grupo que consiste de GMCSF, interferon gama, interferon alfa, interferon beta, interleucina 12, interleucina 23, interleucina 17, interleucina 2, interleucina 1, TGF, TNF α e TNF β .

11. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que dito adjuvante é um agonista Receptor Semelhante a Tol [TLR].

12. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que tal agonista TLR é selecionado a partir do grupo que consiste em: oligonucleotídeos CpG, flagelina, monofosforil lipídeo A, poli I:C e seus derivados.

13. Composição de vacina, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que tal adjuvante é um derivado de parede celular bacteriana tal como dipeptídeo de muramil (MDP) e/ou trehalose dicorinemicolato (TDM).

FIGURA 1A

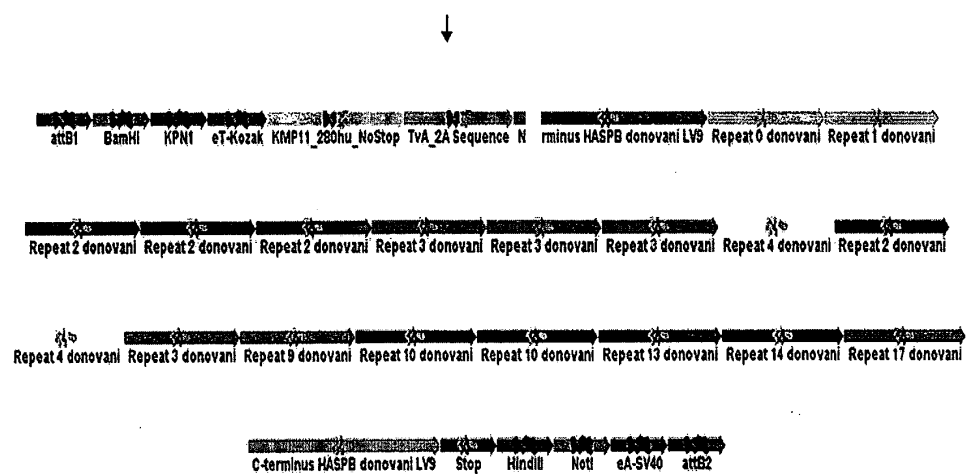


FIGURA 1B

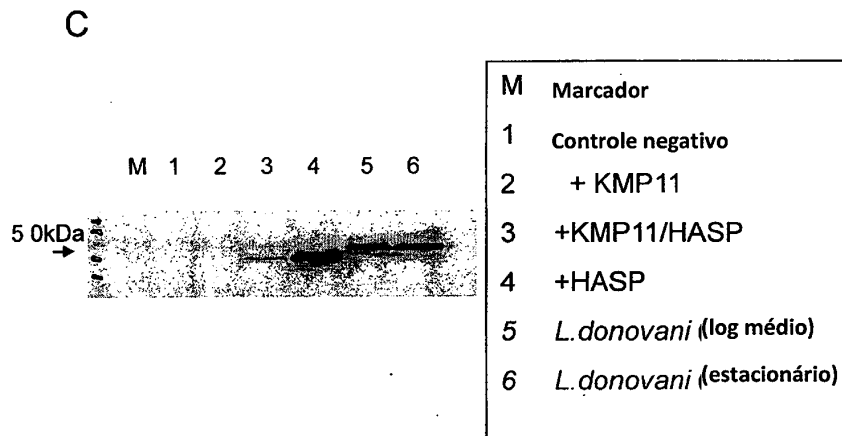
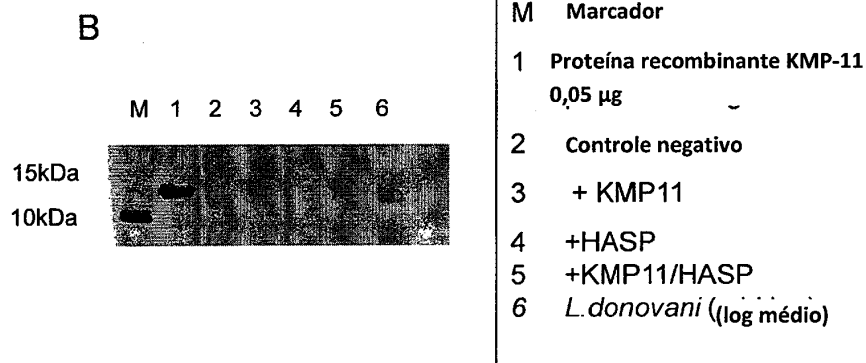


FIGURA 2A

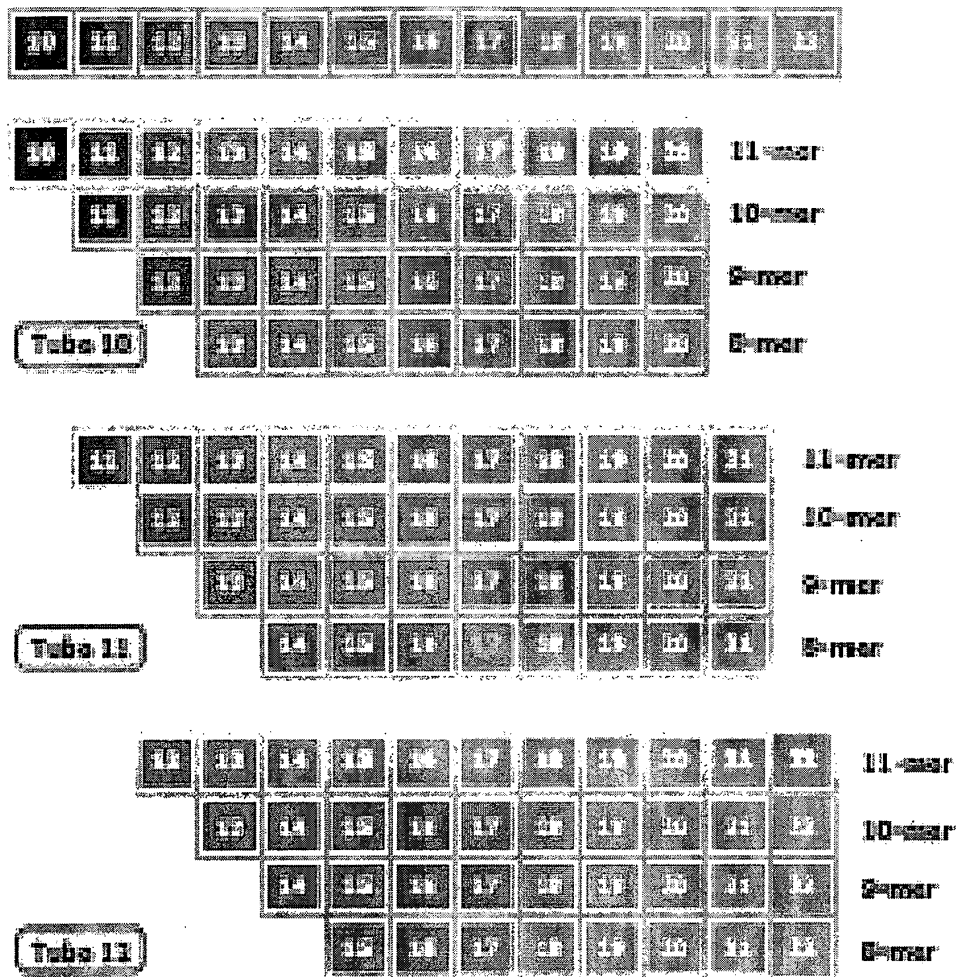


FIGURA 2

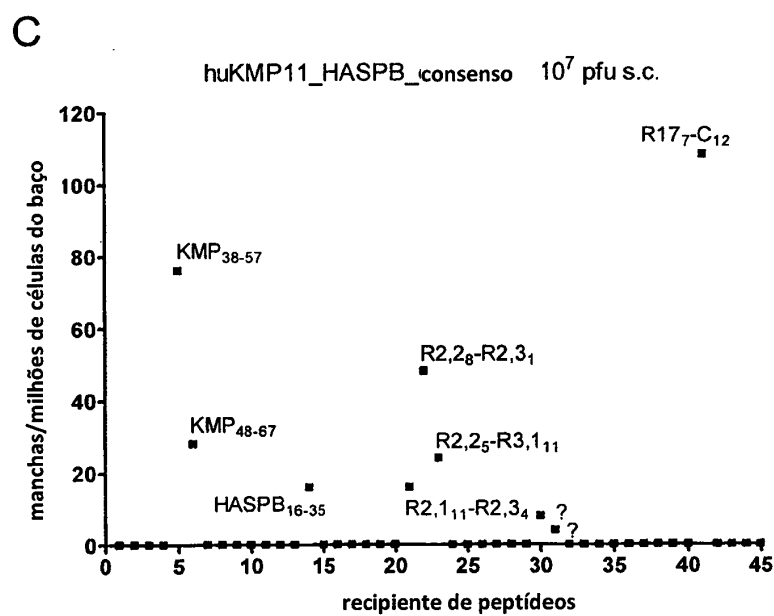
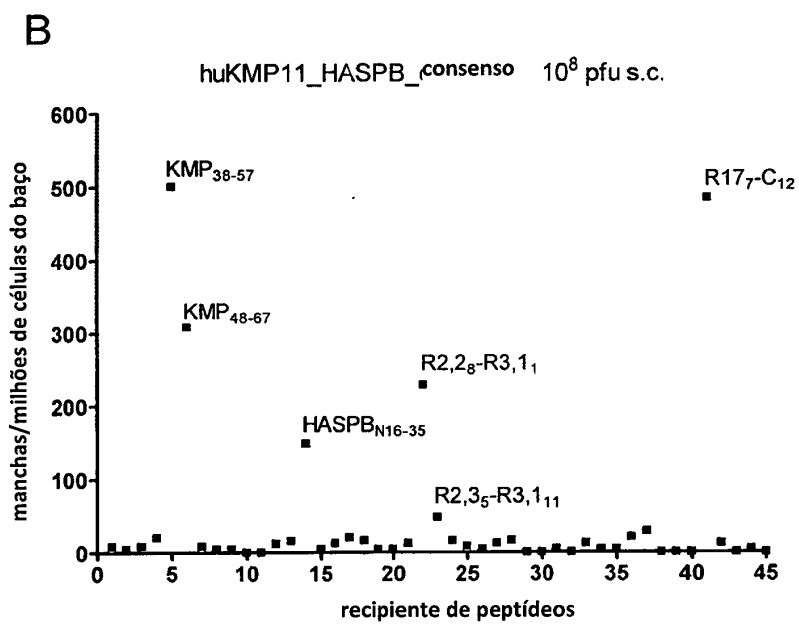


FIGURA 2D

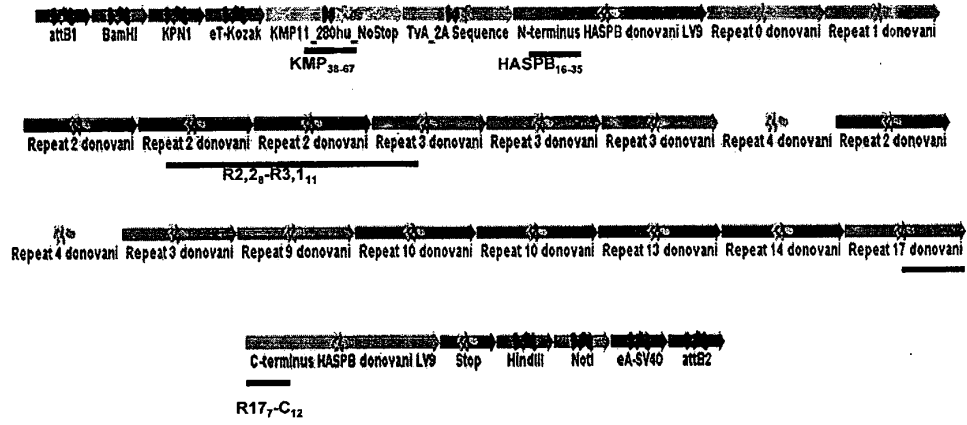
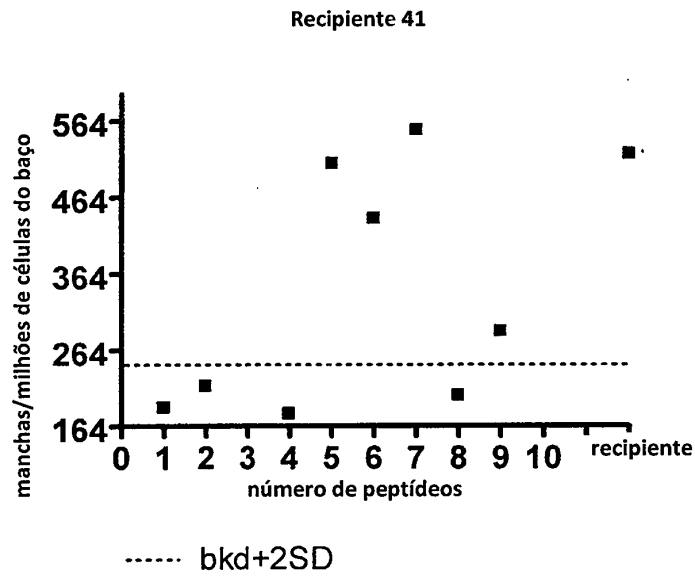
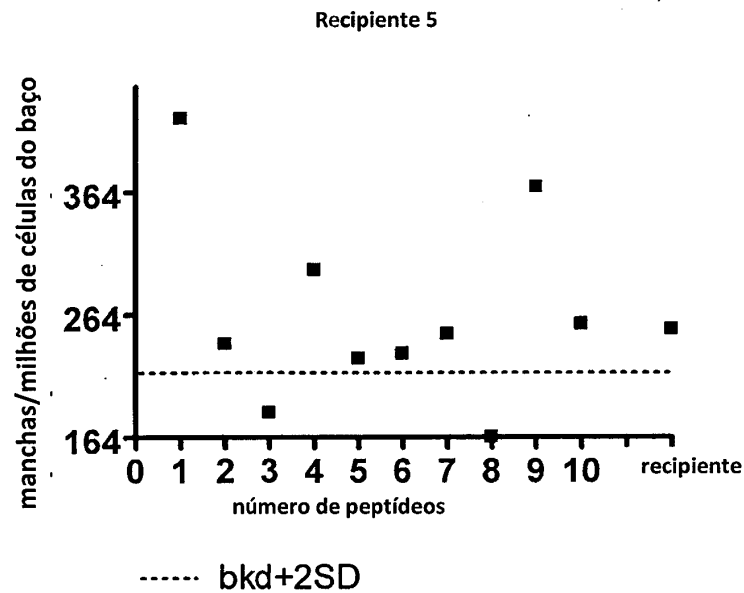


Figura 3A



- 1= 401. TQKNDDGGPKE, QKNDDGGPKE, KNDDGGPKE, NDDGGPKE
 2= 402. QKNDDGGPKEG, KNDDGGPKEG, NDDGGPKEG, DDGGPKEG
 3= 403. KNDDGGPKEGE, NDDGGPKEGE, DDGGPKEGE, DGGPKEGE
 4= 404. NDDGGPKEGEN, DDGGPKEGEN, DGGPKEGEN, GGPKEGEN
 5= 405. DDGGPKEGENL, DGGPKEGENL, GGPKEGENL, GPKEGENL
 6= 406. DGGPKEGENLQ, GGPKEGENLQ, GPKEGENLQ, PKEGENLQ
 7= 407. GGPKEGENLQQ, GPKEGENLQQ, PKEGENLQQ, KEGENLQQ
 8= 408. GPKEGENLQQN, PKEGENLQQN, KEGENLQQN, EGENLQQN
 9= 409. PKEGENLQQND, KEGENLQQND, EGENLQQND, GENLQQND
 10= 410. KEGENLQQNDG, EGENLQQNDG, GENLQQNDG, ENLQQNDG

FIGURA 3B



- 1- 41. STLSPEMKEHY, TLSPEMKEHY, LSPEMKEHY, SPEMKEHY
- 2- 42. TLSPEMKEHYE, LSPEMKEHYE, SPEMKEHYE, PEMKEHYE
- 3- 43. LSPEMKEHYEK, SPEMKEHYEK, PEMKEHYEK, EMKEHYEK
- 4- 44. SPEMKEHYEKF, PEMKEHYEKF, EMKEHYEKF, MKEHYEKF
- 5- 45. PEMKEHYEKF, EMKEHYEKF, MKEHYEKF, KEHYEKF
- 6- 46. EMKEHYEKF, MKEHYEKF, KEHYEKF, EHYEKF
- 7- 47. MKEHYEKF, KEHYEKF, EHYEKF, HYEKF
- 8- 48. KEHYEKF, EHYEKF, HYEKF, YEKF
- 9- 49. EHYEKF, HYEKF, YEKF, EKFERMIK
- 10- 50. HYEKF, YEKF, EKFERMIK, KFERMIK

Figura 4A

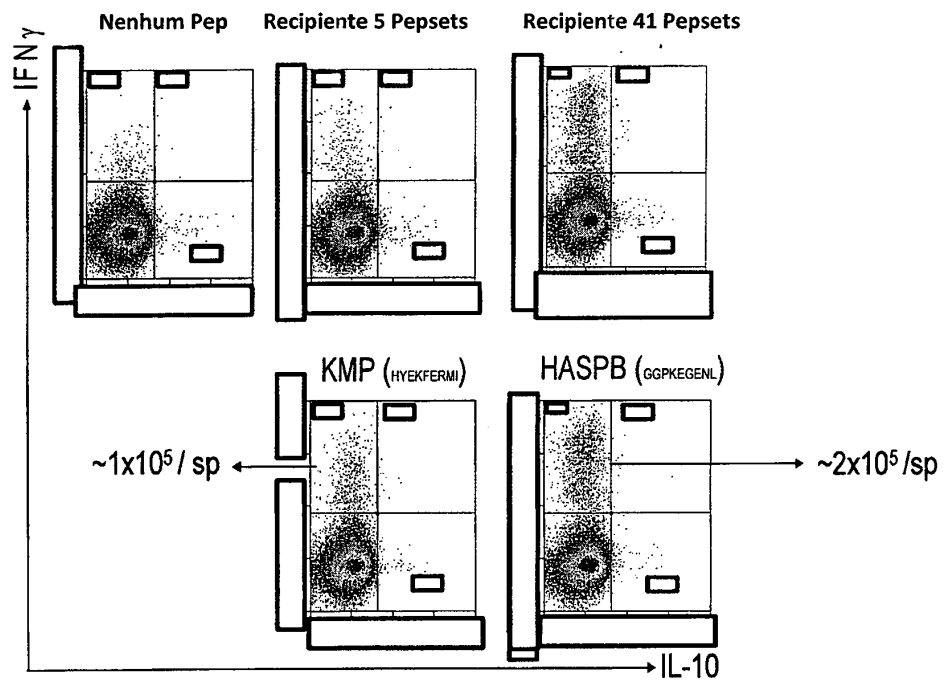


Figura 4B

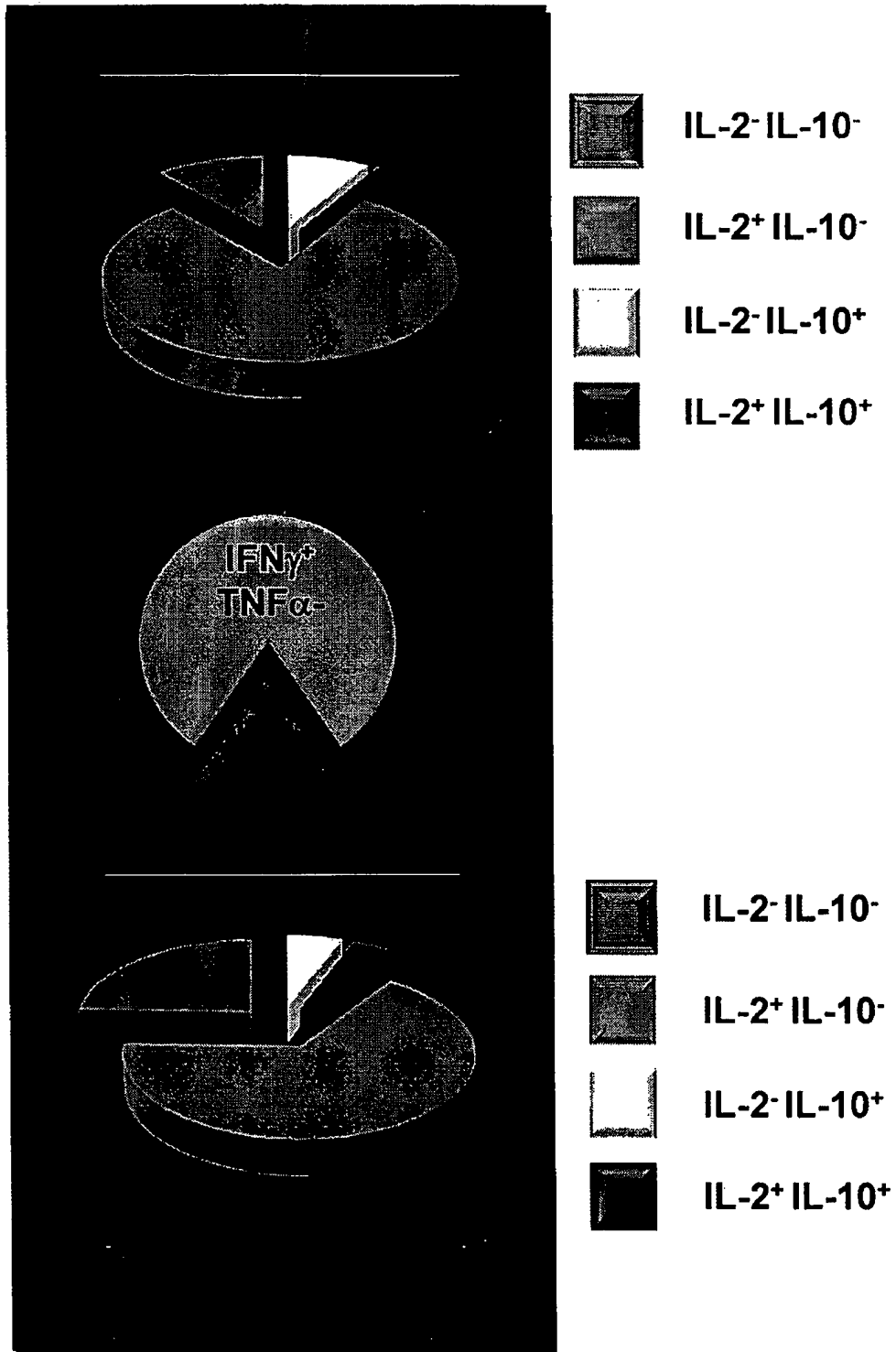


FIGURA 5A

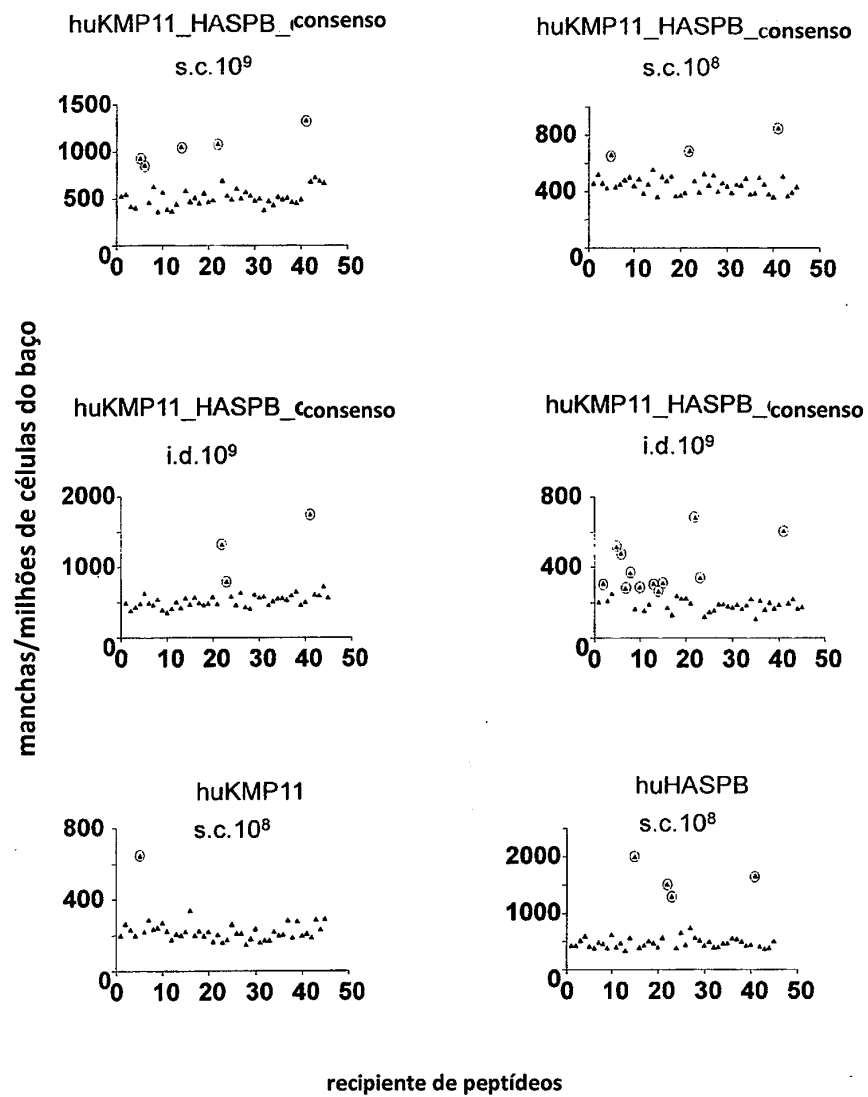


FIGURA 5

B

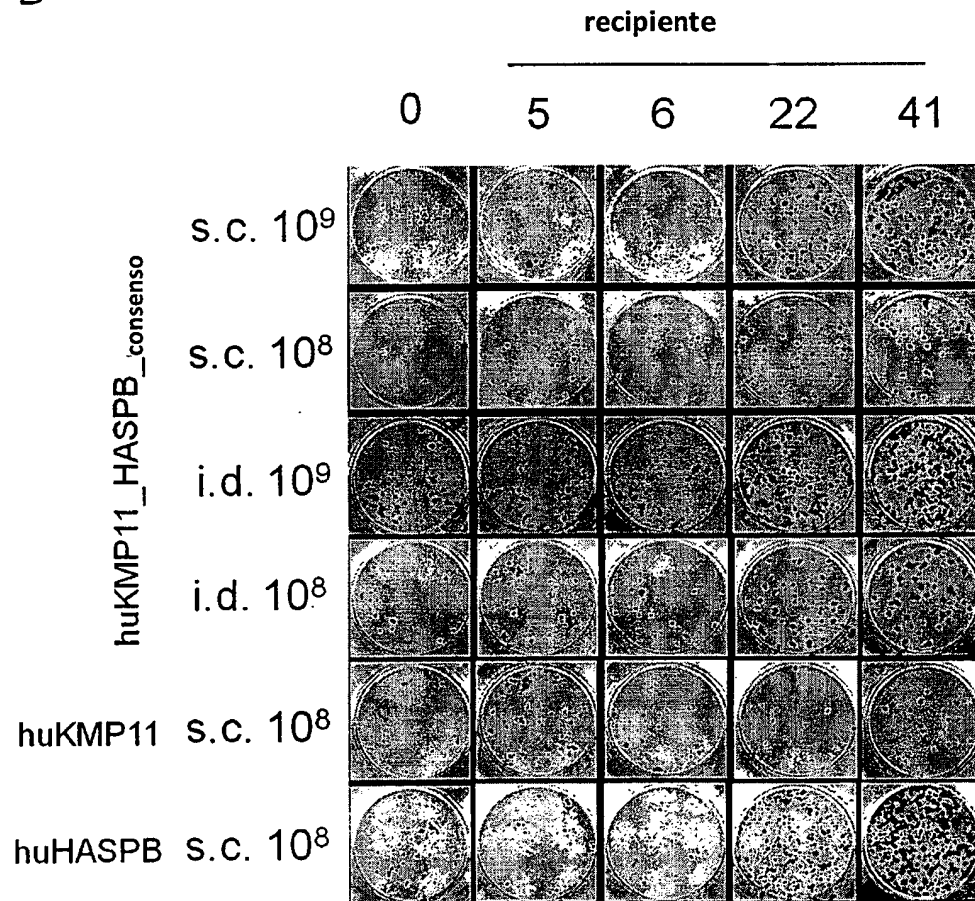
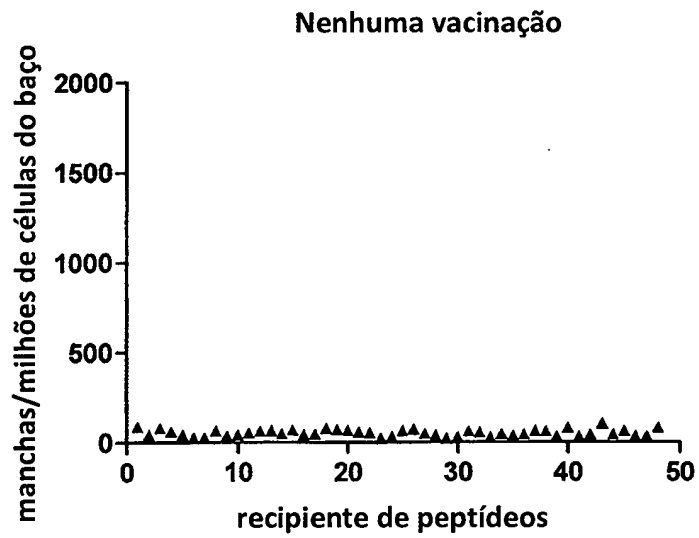


FIGURA 5C

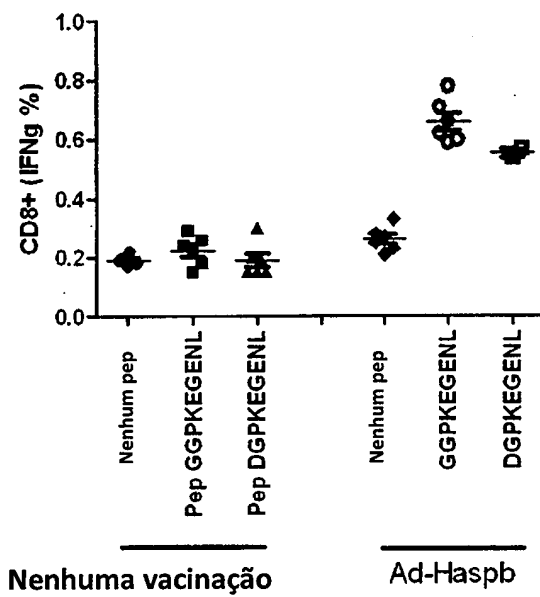
	popliteal	Inguinal esquerdo	Inguinal direito	braço
naive				
s.c. (base da cauda)				
i.d. (coxim plantar)				

FIGURA 6

A



B



C

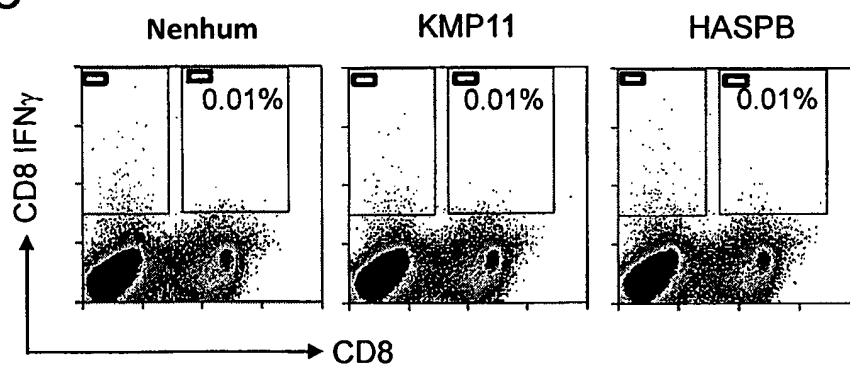


FIGURA 7

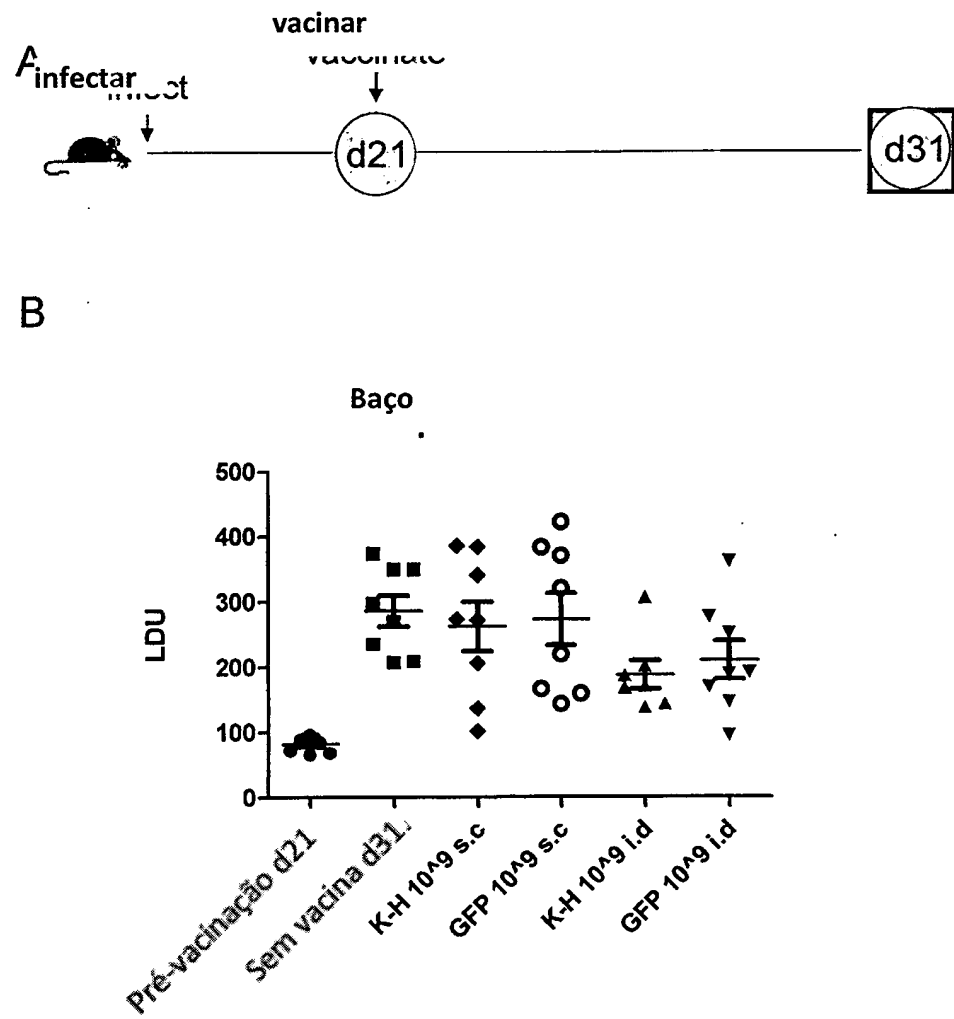


FIGURA 7

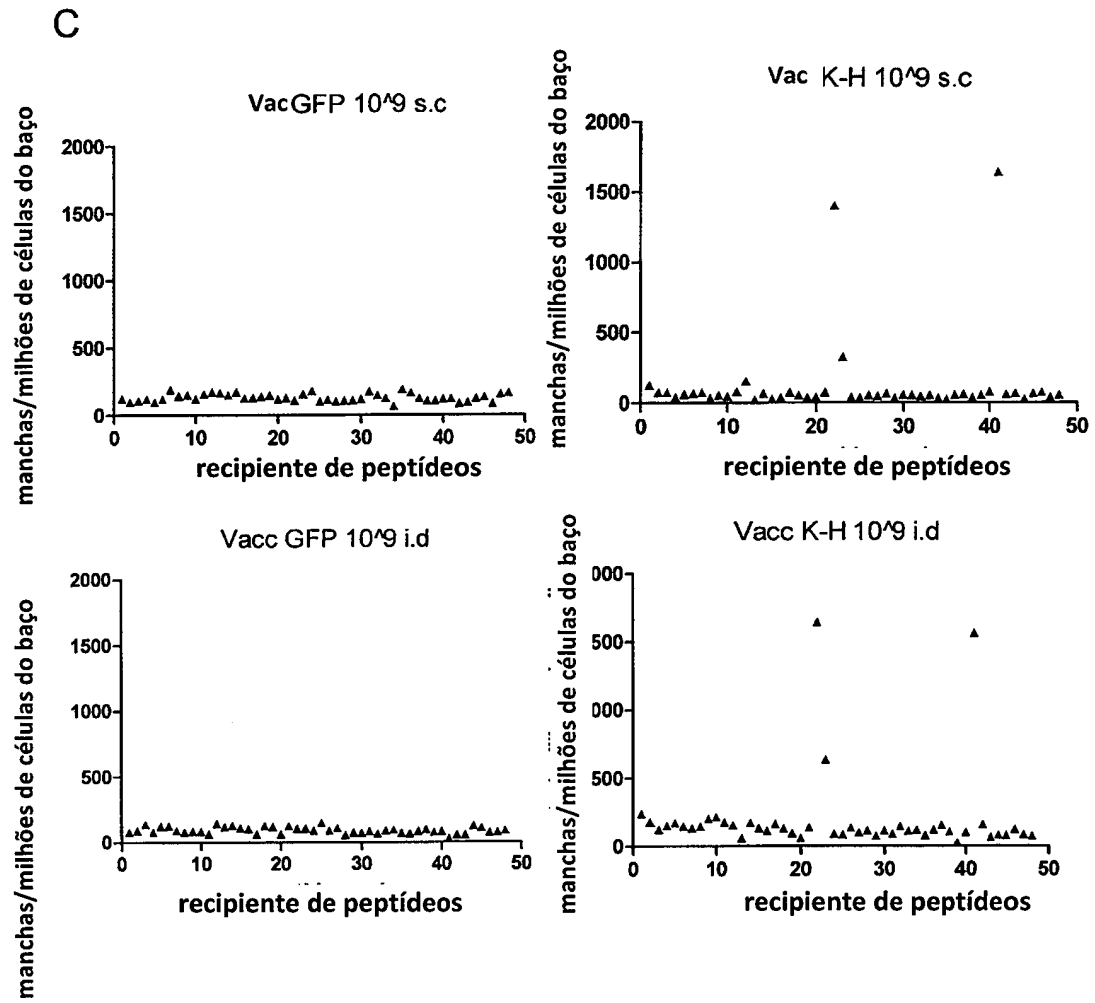
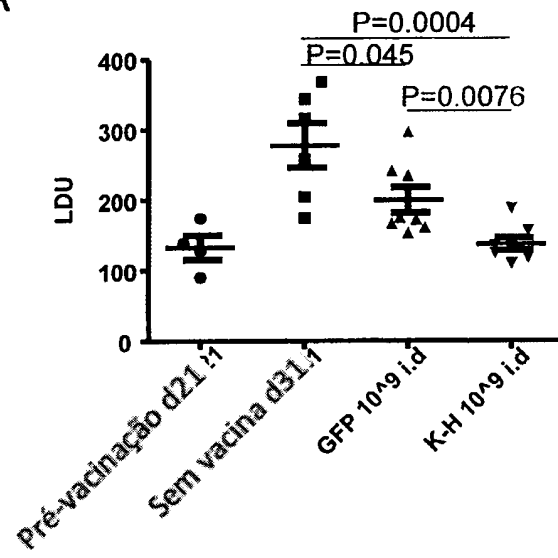


FIGURA 8

A



B

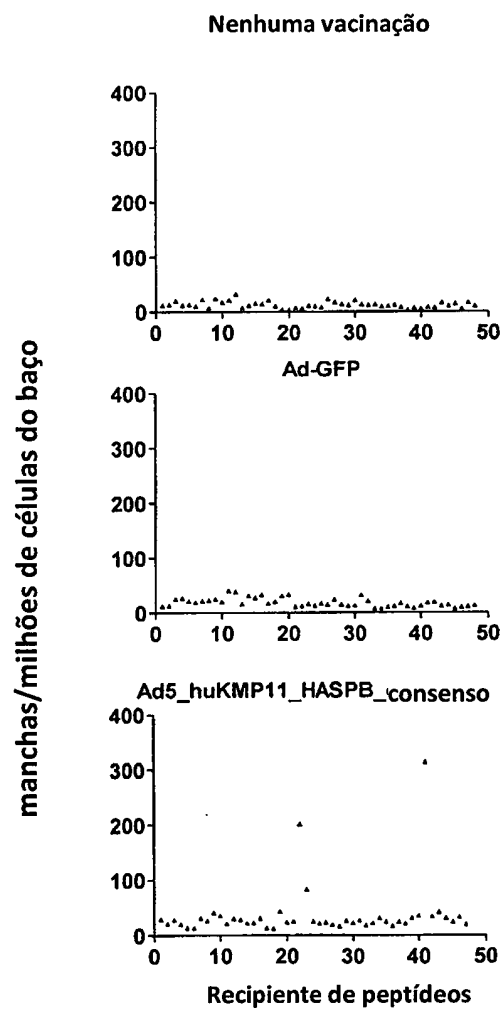
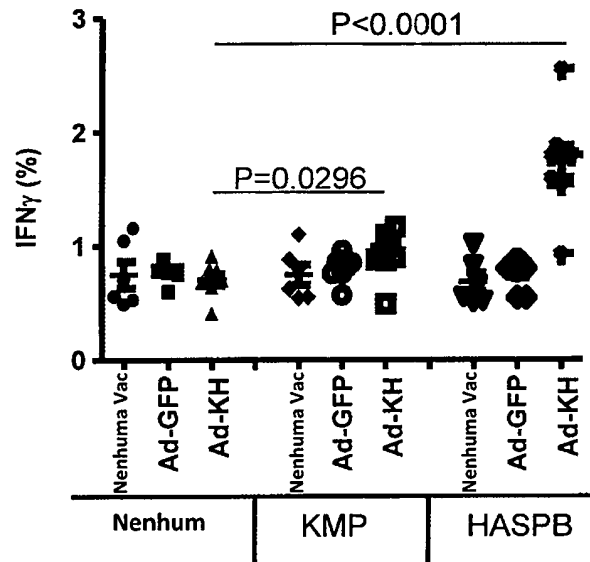


FIGURA 8

C



D

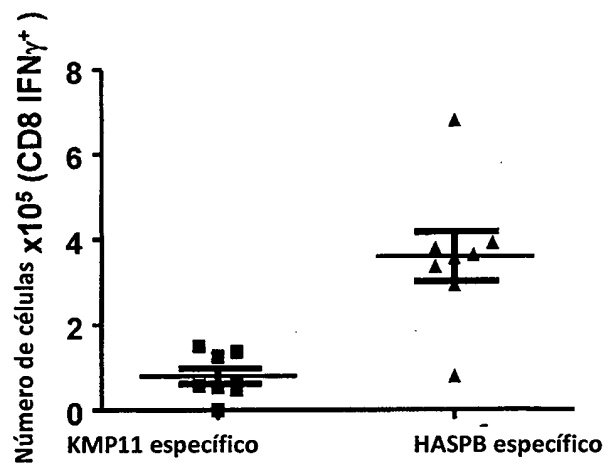


FIGURA 9

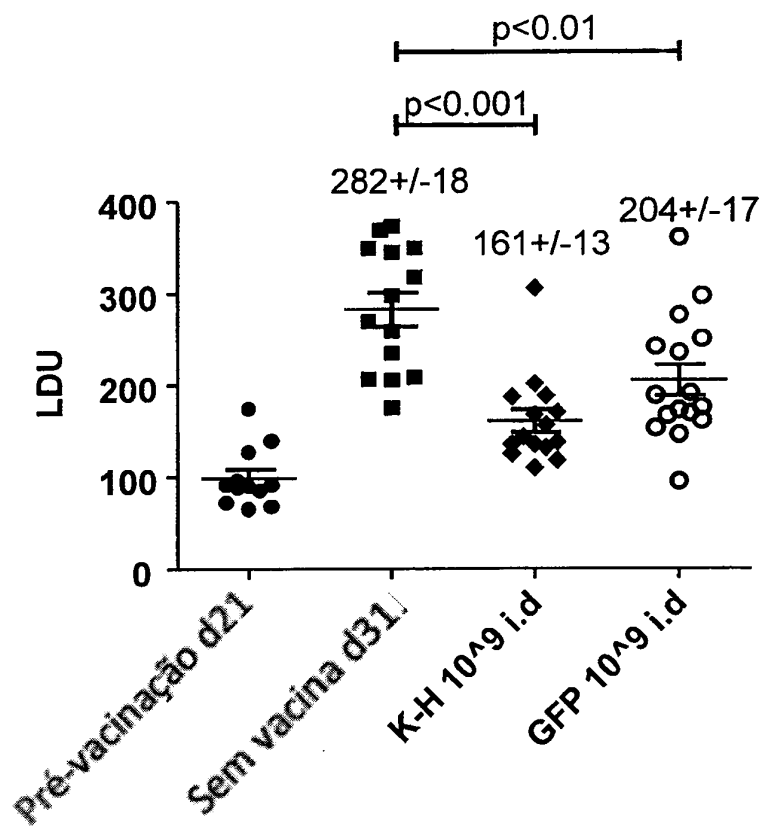


FIGURA 10A

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGATCCGGTACCACCATGGGAACCTCATGTACTAAAGACTCAGCAAAAGAA
 CCTCAGAAACGCGCGGATAACATCCATAAAACCACCGAGGCTAATCATGGCGGTGCCACCGGCGTCCCACCTAAACATAC
 AGGATCTGCTATGAACGACTCTGCACCGAAAGAAGATGGCCACACTCAGAAGAATGACGGTGGTGGACAAAGGAGGATG
 GTCACACACAGAACAACGACGGGGGCGGGCCCAAGGAAGACGATCACGCTCACAATGATGGAGGCGGACCCAAGGAGGAC
 GATCATGCCATAATGACGGGGGAGGCCCTAAGGAGGATGATCATGCCACAATGACGGTGGCGGGCCCTAAGGAGGACGG
 CCATACTCAGAAAAATGATGGGGATGGCCCTAAAGAGGATGGCCACACGCAGAAAAACGATGGCGATGGCCCTAAGGAGG
 ACGGTCACACCCAGAAAAATGACGGAGATGGGCCAAAAGAAGATGACCACGCACACAACGATGGCGACGGGCCCTAAGGAA
 GACGACCACGCACATAACGATGGGGGCGGACCTAAAGAGGACGACCACGCCACAATGATGGGGATGGACCTAAGGAAGA
 TGGCCATACCCAGAAGAACGACGGCGATGGCCCAAAGGAAGATGGGCACACACAGAAGAATGATGGCGATGCTCCAAAGG
 AGGATGGACGAACGCAAAAGAACGATGGGGACGGACCTAAGGAGGACGGAAGGACTCAGAAAAACGACGGTGACGGGCC
 AAGAAGGATGGCCATACGCAGAAAAATGACGGCGACGGACCCAAAGAGGATGACCACCCAGAGAAGATGATGGTGATGG
 GCCGAAAGAGGACGGACGCCTCAGAGAACGATGATGGCGGGCCCTAAAGAAGGCGAAAAATTTGCAACAGAACGATGGGG
 ATGCCCCAAGAGAAAAACGAAGATGGGCATAACGTTGGTGACGGGGCGAATGGGAATGAGGACGGGAACGATGACCAGCCT
 AAGGAACACGCAGCGGGGAACCTGAAAGCTTGCGGCCGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAA
 CTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAAT
 AAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTA
 AAACCTCTACAAATGTGGTAACCCAGCTTTCTTGTAACAAGTGGTCCCC

FIGURA 10b

MGTSCTKDSAKEPQKRADNIHKTTEANHGGATGVPPKHTGSAMNDSAPKEDGHTQKNDGGGPKEDGHTQNNDDGGGPKEDD
 HAHNDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDGHTQKNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKED
 DHAHNDGDGPKEDDHAHNDGGGPKEDDHAHNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKEDGHTQKNDGDAPKEDGRTQKNDGDGPKED
 DGRTOKNDGDGPKKDGHTQKNDGDGPKEDDHTQKNDGDGPKEDGRTQKNDGGGPKEDGRTQKNDGGGPKEDGRTQKNDGGGPKED
 ANGNEDGNDDQPKHAAGN

Figura 11a

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGGATCCGGTACCACCATGGGCACCTTCATGTACAAAAGATTCAGCCAAAGAA
 CCTCAGAAACGCGCAGACAACATCCATAAAACAACAGAAGCTAACCACGGCGGCGCCACAGGCGTACCTCCTAAGCACAC
 CGGGTCCGCAATGAATGATTCGCGACCAAAGAGGACGGCCACACGCAGAGAAGACGATGGGGGTGGCCCAAAGGAGGACG
 GCCATACACAGAATAACGATGGCGGAGGGCTTAAGGAAGACGACCACGCACATAATGATGGAGGCGGTCCCAAAGAGGAC
 GGGCACACCCAGAAAAATGATGGGGACGGACCTAAAGAGGACGATCAGCCCCACAATGATGGAAACGGGCCTAAGGAGGA
 TGACCACGCCCATAATGATGGGGGCGGACCTGAAGAAGACGGCCATACCCAAAGAACGACGGTGACGGCCCAAAGAGG
 ATGATCACGCTCATAACGATGGGGACGGGCCCAAAGAGGATGATCAGCCCCACAACGATGGCGGATGTCCCAAAGAGGAC
 GACCACGCGCACAATGATGGGGGCGGACCTAAGGAAGACGGACACACCCAGAAGAACGATGGCGATGGACCAAAGAAGGA
 CGACCACGCGCATAACGATGGTGACGGTCCGAAGAGGATGACCACGCCCATAACGATGGGGACGGCCCTAAGGAGGACG
 GCCACACTCAGAAAAACGATGGGGACGGTCCAAAGGAAGATGGGCACACACAGAAGAATGATGGCGATGCTCCCAAGGAG
 GACGGTCGCACACAGAAGAATGACGGCGATGGGCCTAAGGAAGATGGGAGAACCCAGAAGAACAATGGTGACGGACCAAA
 GGAAGATGGGCACACACAGAAGAATGATGGCGATGCTCCGAAGGAAGATGGACGCACCCAAAGGAATGACGGAGACGGAC
 CCAAAGAAGATGATCAGCCCCACAATGATGGAGGCGGCCCTAAAGAGGATGGGCACACACAGAAGAACGACCCCAAGAA
 GATGGACACACCCAGAAAAACGATGGTGACGGCCCCAAGGAGGATGACCACACACAGAAGAATGACGGCGACGGACCCAA
 AGAGGATGGCCGCACCCAGAAAAATGACGACGGTGGCCCCAAGAGGACGGCCATACTCAGAAGAACGACGGCGATGGAC
 CTAAAGAGGACGGTAGGACTCAGAAGAATGATGGGGGTGGCCCTAAGGAGGATGATCATGCCACAGTGACGGCGGAGGC
 CCCAAGGAAGCGAGAACCCTCAGCAGAACGACGGTGGCCCTAAAGAGGGTGAAAACCTCAGCAGAATGACGGTGATGC
 TCAGGAGAAGAACGAGGATGGCCACAACGTCGGTGATGGGGCTAACGGGAATGAGGATGGCAATGATGACCAGCCGAAAG
 AGCAGCGCCCGGTAATTGAAAGCTTCTCGAGGCGGCCCGAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC
 AACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCA
 ATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAG
 TAAAACCTCTACAAATGTGGTAACCCAGCTTTCTGTACAAAGTGGTCCCC

Figura 11b

MGTSC TKDSAKEPQKRADNIHKTTEANHGGATGVPPKHTGSAMNDSAPKEDGHTQKNDGGGPKEDGHTQNDGGGPKEDD
 HAHNDGGGPKEDGHTQKNDGDGPKEDDHAHNDGNGPKEDDHAHNDGGGPEEDGHTQKNDGDGPKEDDHAHNDGDGPKEDD
 HAHNDGGCPKEDDHAHNDGGGPKEDGHTQKNDGDGPKDDHAHNDGDGPKEDDHAHNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKEDG
 HTQKNDGDAPKEDGRTQKNDGDGPKEDGRTQKNGDGPKEGHTQKNDGDAPKEDGRTQKNDGDGPKEDDHAHNDGGGPK
 EDGHTQKNDPKKDGHTQKNDGDGPKEDDHTQKNDGDGPKEDGRTQKNDGGGPKEDGHTQKNDGDGPKEDGRTQKNDGGG
 KEDDHAHSDGGGPKESLENLQONDGGPKEGENLQONDGDAQEKNEGDGHNVDGANGNEDGNDDQPKHAAGN

Figura 12a

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGGATCCGGTACCACCATGGCCACCACATATGAAGAATTTAGCGCAAACTG
 GATAGGCTGGACGAGGAGTTTAAACGGGAAAATGCAGGAACAAAACGCAAAATTCCTTGACAGACAAGCCCGATGAAAGCAC
 CCTGTCCCCCGAGATGAAAGAGCACTATGAGAAATTTGAGAGGATGATTAAAGAGCACACTGAAAAGTTCAATAAGAAAA
 TGCACGAACATAGCGAACATTTTAAGCAGAAATTCGCAGAACTCCTGGAACAGCAGAAGGCAGCTCAATACCCCTCCAAA
 AGGGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGCCCATGGGAACCTCATGTACTAA
 AGACTCAGCAAAAAGAACCTCAGAAACGCGCGGATAACATCCATAAAACCACCGAGGCTAATCATGGCGGTGCCACCGGCG
 TCCCACCTAAACATACAGGATCTGCTATGAACGACTCTGCACCGAAAAGAAGATGGCCACACTCAGAAGAATGACGGTGGT
 GGACCAAGGAGGATGGTCACACACAGAAACAACGACGGGGCGGGCCCAAGGAAGACGATCAGCTCACAATGATGGAGG
 CGGACCCAAGGAGGACGATCATGCCCATAATGACGGGGGAGGCCCTAAGGAGGATGATCATGCCCAATGACGGTGGCG
 GCCCTAAGGAGGACGGCCATACTCAGAAAAATGATGGGGATGGCCCTAAGGAGGATGGCCACACGAGAAAAACGATGGC
 GATGGCCCTAAGGAGGACGGTCACACCCAGAAAAATGACGGAGATGGGCCAAAAGAAGATGACCACGCACACAACGATGG
 CGACGGGCCCTAAGGAAGACGACCACGCACATAACGATGGGGGCGGACCTAAGAGGACGACCACGCCACAATGATGGGG
 ATGGACCTAAGGAAGATGGCCATACCCAGAAGAACGACGGCGATGGCCCAAGGAAGATGGGCACACACAGAAGAATGAT
 GGCATGCTCCAAGGAGGATGGACGAACGCAAAAGAACGATGGGGACGGACCTAAGGAGGACGGAAGGACTCAGAAAAA
 CGACGGTGACGGGCCCAAGAAGGATGGCCATACGCAGAAAAATGACGGCGACGGACCCAAAGAGGATGACCACACCCAGA
 AGAATGATGGTGATGGGCCGAAAGAGGACGGACGCACCTCAGAAGAACGATGATGGCGGGCCTAAAGAAGGCGAAAATTTG
 CAACAGAACGATGGGGATGCCCAAGAGAAAAACGAAGATGGGCATAACGTTGGTGACGGGGCGAATGGGAATGAGGACGG
 GAACGATGACCAGCTAAGGAACACGCAGCGGGGAACCTGAAAGCTTGCGGCCGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAG
 TTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAAAC
 CATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAAACAACAACAAATTCATTCTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG
 TTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

Figura 12b

MATTYEEFSAKLDRLEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTEKFNKMKHEHSEHFKQKFAEL
 LEQQKAAQYPSKRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMGTSCTKDSAKEPQKRADNIHKTTEANHGGATGVPPKHTGSAMNDSAP
 KEDGHTQKNDGGGPKEDGHTQNDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDGHTQKNDGDG
 PKEDGHTQKNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKEDDHAHNDGDGPKEDDHAHNDGGGPKEDDHAHNDGDGPKEDGHTQKNDGD
 GPKEDGHTQKNDGDAPKEDGRTQKNDGDGPKEDGRTQKNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKEDDHTQKNDGDGPKEDGRTQK
 NDDGGPKEGENLQQNDGDAQEKNEGDHNVGDGANGNEDGNDDQPKEHAAGN

Figura 13a

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGGATCCGGTACCACCATGGCCACCACATATGAAGAATTTAGCGCAAACTG
 GATAGGCTGGACGAGGAGTTTAACCGGAAAATGCAGGAACAAACGCAAAATCTTTGCAGACAAGCCCCGATGAAGCAC
 CCTGTCCCCGAGATGAAAGAGCACTATGAGAAATTTGAGAGGATGATTAAAGAGCACACTGAAAAGTTCAATAAGAAAA
 TGCACGAACATAGCGAACATTTTAAGCAGAAATTCGCAGAACTCTGGAACAGCAGAGGCAGCTCAATACCCCTCCAAA
 AGGGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAAATCCCGGCCCATGGGCACCTCATGTACTAA
 AGACTCCGCGAAGGAACCCAGAGAGAGCTGATAATATTCACAAAACCTACCGAAGCTAATCATGGTGGGGCCACAGGCG
 TTCCCCCAAACACACCGGTAGCGCCATGAACGACTCTGCTCCGAAGGAGGACGGTCACACTCAGAAAAACGATGGAGGC
 GGCCCAAAGGAGGATGGCCATACCCAAAATAATGACGGGGGAGGGCCCAAAGAGGATGATCACGCTCACAATGATGGCGG
 AGGACCCAAAGGAGGATGGACACACCCAGAAAGATGACGGAGACGGCCCAAAGAGGACGACCATGCTCACAACGACGGTA
 ATGGTCCAAAAGAGGACGATCACGCCATAACGACGGAGGCGGCCTGAGGAGGACGGGCACACCCAAAAGAAATGACGGC
 GACGGACCAAAGGAGACGACACCGGCATAATGACGGGAGACGGTCCCAAGGAAGATGATCATGCCCAATGACGGAGG
 GTGTCCGAAGGAGGATGACACGCACACAACGACGGAGGAGTCTTAAGGAGGATGGGCACACCCAGAAAAACGATGGAG
 ACGGCCCTAAAAGGATGATCACGCCACAACGATGGTGACGGGCCTAAGGAAGATGACCATGCCCAATGATGGTGAC
 GGCCCAAAGGAAGACGGGCATACCCAGAAAAATGATGGCGATGGTCCAAAGGAAGATGGGCACACACAGAAGAATGATGG
 CGATGCTCCTAAGGAAGACGGAAGAACACAGAAAAACGATGGCGATGGCCCAAGGAAGACGGTAGAACTCAGAAAAACA
 ATGAGAGCGGGCCAAAGGAAGATGGGCACACACAGAAGAATGATGGCGATGCTCCAAAAGAGGATGGACGGACCCAGAGA
 AACGACGGTGATGGTCTTAAGGAGGACGACACCGGCACACGACGGAGGCGGCCCTAAGGAGGATGGTCACACCCAAAA
 GAATGACCCCAAAAAGGATGGACATACCTCAGAAGAATGATGGGGATGGACCAAAGGAGGATGATCACACACAGAAGAAGC
 ATGGAGACGGACCTAAAGAAGATGGTAGAACCCAGAAAAATGACGACGGCGGACCCGAAAGAGGACGGCCACACAGAAA
 AACGATGGAGATGGACCCAAAGAGGACGGAAGGACTCAGAAGAATGACGGGGGTGGGCCAAAGGAAGACGATCACGCACA
 CTCAGACGGAGGAGGGCCCAAGGAATCTGAGAATTTGCAACAGAACGATGGTGGCCCTAAGGAAGGCGAAAAACCTCCAGC
 AGAATGACGGAGACGCCAGGAAAGAACGAAGACGGTCACAACGTCGGGGATGGTGCCAACGGCAACGAAGATGGGAAC
 GATGATCAGCCCAAAGAACACGCCGCTGGAACCTAAAAGCTTCTCGAGGCGGCGCCAGACATGATAAGATACATTGATG
 AGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTA
 ACCATTATAAGCTGCAATAAACAAAGTTAACAAACAATTTGCATTATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGA
 GGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAACCCAGCTTTCTTTGTACAAAGTGGTCCCC

Figura 13b

MATTYEEFSAKLDRLEEFNRKMQEQNAKFFADKPDESTLSPEMKEHYEKFERMIKEHTEKFNKMHSEHSEHFQKQFAEL
 LEQQKAAQYPSKRAEGRGSLTTCGDVEENPGPMGTSTCKDSAKEPQKRADNIHKTTEANHGGATGVPPKHTGSAMNDSAP
 KEDGHTQKNDGGGPKEDGHTQNNDDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDGHTQKNDGDGPKEDDHAHNDGNGPKEDDHAHNDGGG
 PEEDGHTQKNDGDGPKEDDHAHNDGDGPKEDDHAHNDGGGPKEDDHAHNDGGGPKEDGHTQKNDGDGPKEDDHAHNDGDG
 PKEDDHAHNDGDGPKEDGHTQKNDGDGPKEDGHTQKNDGDAPKEDGRTQKNDGDGPKEDGRTQKNDGDGPKEDGHTQKND
 GDAPKEDGRTQKNDGDGPKEDDHAHNDGGGPKEDGHTQKNDPKKDGHGTQKNDGDGPKEDDHTQKNDGDGPKEDGRTQKND
 DGGPKEDGHTQKNDGDGPKEDGRTQKNDGGGPKEDDHAHSDGGGPKESENLQQNDGGPKEGENLQQNDGDAQEKNEDGHN
 VGDGANGNEDGNDQPKHAAGN

Figura 14

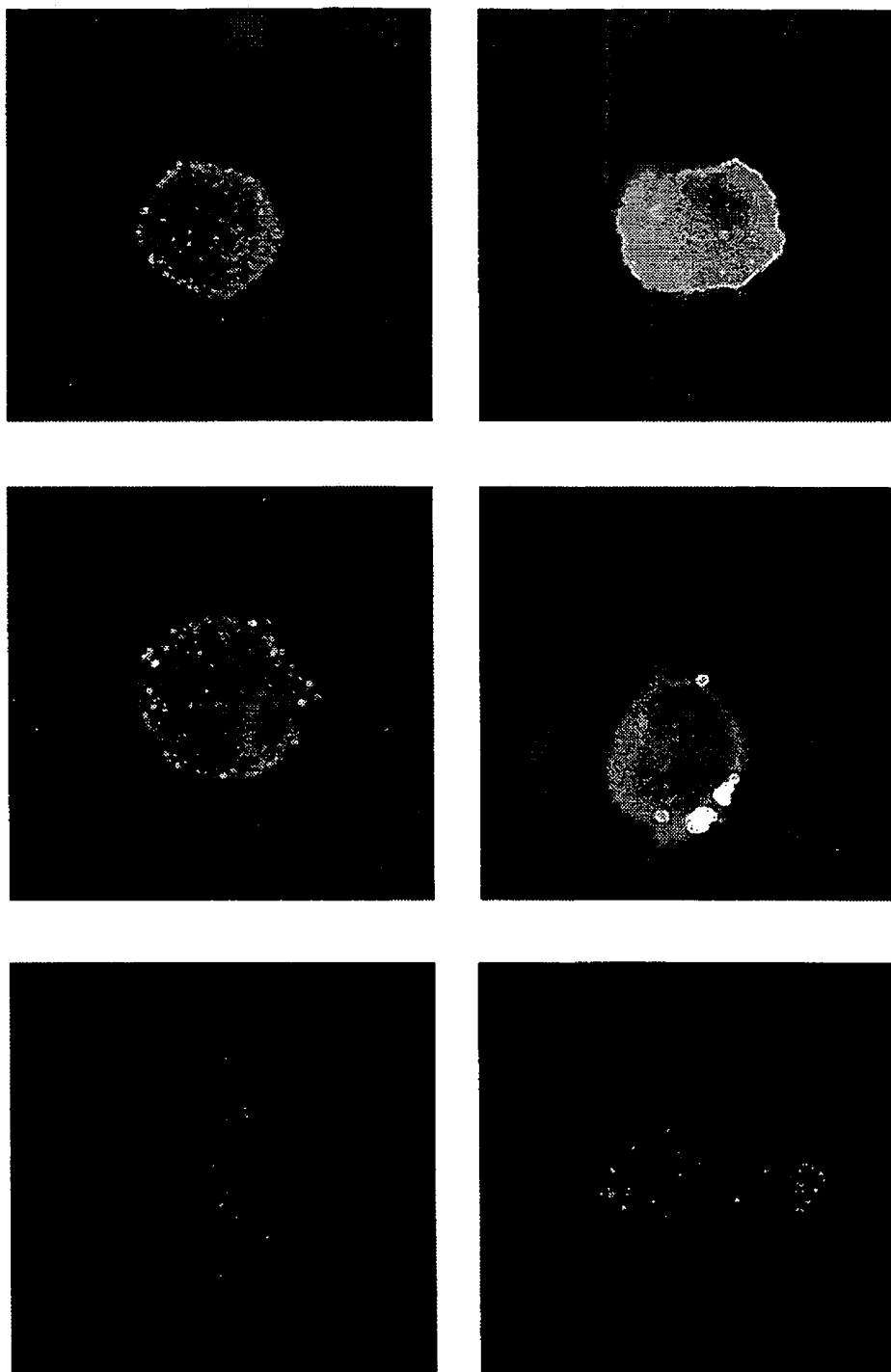


Tabela 1

A) Consenso de repetição de complexo de *L. donovani*

Posição Aa em repetição

[illegible]

*este residuo pode estar faltando

B) Análise de frequência de tipo de repetição em diferentes Leishmania causadoras de doença visceral

[illegible]